



**José Machado
da Costa Eduardo**

**Caracterização genética de *Giardia lamblia* de
origem humana e animal em Portugal**



**José Machado
da Costa Eduardo**

**Caracterização genética de *Giardia lamblia* de
origem humana e animal em Portugal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e da Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Olga Maria Guerreiro de Matos

professora associada com agregação do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa

professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

professora auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, orientadora deste trabalho, o meu obrigado pelo apoio, incentivo e paciência.

À Doutora Maria Adelaide Almeida, co-orientadora deste trabalho e à Doutora Sónia Mendo, coordenadora do mestrado, pela ajuda prestada ao longo de todo o curso.

À Sónia Marisa Machado pela ajuda prestada, quer na recolha e transporte das amostras, quer na colaboração fornecida durante a realização do trabalho.

À Joana Patrícia Ramalho e à associação ABRA, pela colaboração na recolha das amostras dos animais.

À minha família, à minha namorada e aos meus amigos por todo o apoio e paciência.

palavras-chave

Giardia lamblia, genotipagem, assemblage, β -giardina, cães, humanos.

resumo

Giardia lamblia é um organismo protozoário capaz de infectar o tracto intestinal de diversas espécies de animais onde se incluem os mamíferos. A heterogeneidade genética de *G. lamblia* está devidamente comprovada mas o seu potencial zoonótico continua ainda por esclarecer. Neste trabalho, analisaram-se 68 amostras de DNA obtidas a partir de fezes de origem humana e canina, com o objectivo de identificar os assemblages/genótipos que circulam no nosso país. Os resultados obtidos mostraram que os isolados humanos correspondiam aos assemblages A ou B, enquanto que os isolados caninos pertenciam aos assemblages A, C ou D, tendo por base o estudo do *locus* do gene da β -giardina pelas técnicas de PCR-RFLP e sequenciação de DNA. As prevalências dos diferentes assemblages nas amostras humanas foram de 94,1 % (32/34) para o assemblage A e de 5,9 % (2/34) para o assemblage B, enquanto que nas amostras caninas foram de 67,7 % (21/31) para o assemblage A, 6,5 % (2/31) para o assemblage C e de 6,5 % (2/31) para o assemblage D. Foram ainda identificadas 2 amostras caninas co-infectadas com os assemblages A e C (6,5 %) e 4 amostras caninas co-infectadas com os assemblages A e D (12,9 %). De realçar a identificação de um isolado A2, normalmente associado aos humanos, numa amostra de origem canina. A análise filogenética revelou que os isolados do assemblage A provenientes de humanos e animais eram idênticos entre si. Estes dados sugerem que os cães podem desempenhar um papel importante em ciclos zoonóticos de transmissão do parasita.

keywords

Giardia lamblia, genotyping, assemblage, β -giardin, dogs, humans.

abstract

Giardia lamblia is a protozoan organism that can infect the intestinal tract of many animal species including mammals. Genetic heterogeneity of *G. lamblia* is well described but the zoonotic potential is still unclear. In this study, we analysed 68 DNA samples isolated from human and canine stool specimens, to get more insight in the different *G. lamblia* assemblages/genotypes present in our country. Results showed that the human isolates were divided into two main assemblages, A and B, while the canine isolates belonged to the assemblages A, C and D, on the basis of PCR-RFLP assays and DNA sequence analysis of the β -giardin gene. The prevalence of the different assemblages in the human samples was 94.1 % (32/34) for the assemblage A and 5.9 % (2/34) for the assemblage B, while in the canine samples was 67.7 % (21/31) for the assemblage A, 6.5 % (2/31) for the assemblage C and 6.5 % (2/31) for the assemblage D. We also identified 2 co-infections including the assemblages A and C (6.5 %) and 4 co-infections including the assemblages A and D (12.9 %) in dogs. An interesting finding was the identification of an A2 genotype, traditionally linked to human *G. lamblia* infections, in a dog sample. Phylogenetic analysis revealed a close relationship between human and animal assemblage A isolates. These findings suggest that dogs may play an important role in zoonotic transmission cycles of the parasite.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. <i>Giardia lamblia</i>	3
2. Morfologia e ciclo de vida	5
3. Nomenclatura de <i>Giardia</i>	11
4. Patologia e patogénese	12
5. Potencial zoonótico	15
6. Diagnóstico	19
6.1. Observação microscópica de quistos e trofozoítos	19
6.2. Detecção de antígenos nas fezes	20
6.3. Detecção de <i>G. lamblia</i> em fezes por PCR	21
OBJECTIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. Exame parasitológico de fezes	29
1.1. Colheita das amostras	29
1.2. Detecção de antígenos de <i>G. lamblia</i> nas fezes	29
1.3. Exame microscópico após concentração das amostras	30
2. Concentração de quistos de <i>G. lamblia</i> por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose	32
3. Estudo molecular	32
3.1. Extracção de DNA	32
3.1.1. Extracção de DNA a partir de amostras fecais e de quistos concentrados por centrifugação em gradiente de densidade	33
3.1.2. Extracção de DNA a partir de culturas de trofozoítos axenizados	34
3.2. Amplificação de DNA do gene da β -giardina por PCR	35
3.2.1. Visualização dos fragmentos de DNA amplificados	37
3.3. Restrição enzimática dos produtos de PCR (PCR-RFLP)	38
3.3.1. Visualização dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP	38
3.4. Purificação dos produtos de PCR	39

3.5. Sequenciação e análise dos fragmentos de DNA amplificados	39
4. Tratamento estatístico dos dados	40
RESULTADOS	41
1. Estudo coproparasitológico	43
1.1. Detecção de antígenos de <i>G. lamblia</i> – teste imunocromatográfico	43
1.2. Exame microscópico após concentração	44
1.3. Comparação dos dois métodos utilizados na detecção de <i>Giardia</i>	48
2. Estudo molecular	49
2.1. Amplificação de DNA por PCR	49
2.2. Identificação genotípica pela técnica de PCR-RFLP	50
2.3. Identificação genotípica por sequenciação	53
2.4. Alinhamento de sequências	58
2.5. Análise filogenética	60
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO I	101
ANEXO II	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de um trofozoíto de *G. lamblia* (adaptado de Faubert, 2000). _____8

Figura 2 – Ciclo de vida de *G. lamblia*. Os alimentos e águas contaminadas com o parasita são a principal via de transmissão. Depois de se multiplicar no intestino do hospedeiro, o parasita é excretado através das fezes sob a forma de quistos e trofozoítos. Os trofozoítos não sobrevivem no meio ambiente e os quistos, mais resistentes, podem depois vir a infectar outros humanos e/ou determinadas espécies de animais (adaptado de Kayser *et al.*, 2005). _____10

Figura 3 – Esquema representativo dos principais ciclos de transmissão de *G. lamblia* (adaptado de Thompson, 2004). _____16

Figura 4 – Detecção de antígenos de *G. lamblia* pelo método imunocromatográfico (*Simple Giardia*, Operon, s.a.) _____30

Figura 5 – Método de concentração de amostras fecais (*Copropack S.A.F.*, *Biomedics*, S.L.). **a** – frasco com solução fixadora; **b** – filtro de rede; **c** – zaragatoas; **d** – tubo cónico. _____31

Figura 6 – Detecção de antígenos de *G. lamblia* nas fezes pelo método imunocromatográfico (*Simple Giardia*, Operon, s.a.) em função da origem da amostra, humana e canina. _____44

Figura 7 – Detecção de quistos de *Giardia* através da observação microscópica após concentração (*Copropack S.A.F.*, *Biomedics*, S.L.) em função da origem da amostra, humana e canina. _____45

Figura 8 – Distribuição dos parasitas protozoários e helmintas nas amostras de origem canina. A identificação foi realizada através do exame microscópico após concentração das amostras fecais (*Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.*) _____46

Figura 9 – Fotografias de estruturas parasitárias detectadas nas fezes caninas através do exame microscópico após concentração das amostras (*Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.*). **A** – Quisto de *Giardia*; **B** – Ooquisto de *Isospora* sp. **C** – Ovo de *Ancylostoma* spp.; **D** – Ovo de *Trichuris vulpis*; **E** – Ovo de *Toxocara canis*; (Microscópio *Eclipse E400, Nikon*, acoplado à câmara digital DN100, *Nikon*; **A** e **B** ampliação x400; **C**, **D** e **E** ampliação x100) _____46

Figura 10 – Separação electroforética em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos produtos do *nested* PCR do gene da β -giardina. Os fragmentos de 511 pb foram amplificados pelos oligonucleótidos G7, G759, G2007R e G2007F. **M** – Marcador de massa molecular de 100 pb DNA *Ladder*TM; **1 a 6** – Amostras estudadas. _____50

Figura 11 – Separação electroforética em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos produtos do *semi-nested* PCR do gene da β -giardina. Os fragmentos de 383 pb foram amplificado pelos oligonucleótidos G7, G376 e G759. **M** – Marcador de massa molecular de 100 pb DNA *Ladder*TM; **1 a 7** – Amostras estudadas. _____50

Figura 12 – Diferenciação dos assemblages A, C e D por PCR-RFLP. Separação electroforética em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos produtos obtidos após restrição enzimática com a enzima *HaeIII*. A amplificação de fragmentos de 511 pb do gene da β -giardina foi realizada com os oligonucleótidos G7, G759, G2007R e G2007F. (Marcador de massa molecular de 100 pb DNA *Ladder*TM) _____52

Figura 13 – Diferenciação dos assemblages A, B, C e D através de cromatogramas exemplificativos obtidos após sequenciação de fragmentos do gene da β -giardina. **(a)** Detalhe de um perfil característico do assemblage A (G no nt 393 e T no nt 396); **(b)** Detalhe de um perfil característico do assemblage B (A no nt 438 e C no nt 444); **(c)** Detalhe de um perfil característico do assemblage C (G no nt 330 e C nt 333); **(d)** Detalhe de um perfil característico do assemblage D (A no nt 558 e A no nt 576). A numeração dos nucleótidos foi feita em relação à distância do codão de iniciação ATG da estirpe de referência Portland-1 (número de acesso X14185 no *GenBank*) _____ 54

Figura 14 – Distribuição dos assemblages A, B, C e D de *G. lamblia* em função da origem da amostra. Os resultados foram expressos em percentagem do número total de isolados identificados. _____ 57

Figura 15 – Relações entre a quantidade de quistos observados através do exame microscópico e os assemblages/genótipos de *G. lamblia* presentes nas amostras ($\chi^2=42,5$; $p=0,001$). (+: 1 a 5 quistos por preparação; ++: 5 a 10 quistos por preparação; +++: 10 a 20 quistos por preparação; ++++: > 20 quistos por preparação). _____ 57

Figura 16 – Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene da β -giardina de *G. lamblia* (desde o nt 383 até ao nt 609). As sequências [Portland1], [AY072723], [AY072724], [AY072726], [AY545646] e [AY545647] foram obtidas do *GenBank* e usadas como referência para as amostras apresentadas [X2], [H25] [N1], [X5], [X4], [X7], [X1], [N15], e [N17]. A numeração dos nucleótidos foi feita em relação à distância do codão de iniciação ATG da estirpe de referência Portland-1, número de acesso X14185 no *GenBank*. Os asteriscos indicam as posições onde os nucleótidos são iguais. _____ 59

Figura 17 – Análise filogenética de *G. lamblia* pelo método de *neighbour-joining* de sequências do gene da β -giardina (desde o nt 383 até ao nt 609), obtida pelo programa *MEGA* versão 4.0. As amostras analisadas foram comparadas com as sequências de referência: genótipo A1 [Portland1]; genótipo A2 [AY072723]; genótipo A3 [AY072724]; genótipo B4 [AY072726]; assemblage C [AY545647]; assemblage D [AY545646]; assemblage E [EU189373] e assemblage F [AY647264] obtidas do *GenBank*. _____61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Oligonucleótidos sintéticos usados nas reacções de PCR para amplificação de fragmentos de 384 pb e 511 pb do gene da β -giardina, segundo Cacciò *et al.* (2002) e Lalle *et al.* (2005), respectivamente. _____36

Tabela II – Condições das reacções de PCR para amplificação de fragmentos específicos do gene da β -giardina segundo Cacciò *et al.* (2002). _____36

Tabela III – Condições das reacções de PCR para amplificação de fragmentos específicos do gene da β -giardina segundo Lalle *et al.* (2005). _____37

Tabela IV – Pesquisa de antígenos de *G. lamblia* nas fezes humanas e caninas pelo teste imunocromatográfico (*Simple Giardia, Operon, s.a.*) _____44

Tabela V – Distribuição das amostras em função da quantidade de quistos de *G. lamblia* observados por preparação através do exame microscópico após concentração da amostra (*Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.*). (+: 1 a 5 quistos por preparação; ++: 5 a 10 quistos por preparação; +++: 10 a 20 quistos por preparação; ++++: > 20 quistos por preparação). _____47

Tabela VI – Comparação dos métodos imunocromatográfico e exame microscópico após concentração na detecção de *G. lamblia* em função da origem das amostras, humanas e caninas. ($k=0,761$; $p<0,001$) _____48

Tabela VII – Diferenciação dos assemblages A, B, C, D, E e F por restrição enzimática do fragmento de 511 pb do gene da β -giardina como descrito previamente (Lalle *et al.*, 2005). _____51

Tabela VIII – Distribuição dos assemblages de *G. lamblia* em função da origem das amostras, humanas e caninas. A identificação dos assemblages foi realizada pela técnica de PCR-RFLP através do fragmento de 511 pb do gene da β -giardina segundo Lalle *et al.* (2005). _____53

Tabela IX – Distribuição dos assemblages e genótipos de *G. lamblia* em função da origem das amostras, humanas e caninas. A genotipagem foi realizada por sequenciação de fragmentos do gene da β -giardina. _____56

LISTA DE ABREVIATURAS

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

A – Adenina

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

C – Citosina

CD – *Cluster of Differentiation*

dATP – Ácido desoxiadenílico

dCTP – Ácido desoxiguanílico

dGTP – Ácido desoxicitidílico

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dTTP – Ácido desoxitimidílico

G – Guanina

Gdh – Glutamato Desidrogenase

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

nt – Nucleótido

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de Bases

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – RNA Ribossômico

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

T – Timina

Tpi – Triosefosfato Isomerase

INTRODUÇÃO

1. *Giardia lamblia*

Giardia lamblia, também designada de *G. intestinalis* ou *G. duodenalis*, foi pela primeira vez descrita em 1681 por Antonie van Leeuwenhoek que observou o organismo ao microscópio enquanto estudava as suas próprias fezes diarreicas (Dobell, 1920). Contudo, a descoberta do flagelado *Giardia* acabou por ser atribuída ao checo Vilem Lambl por ter descrito com grande detalhe o microrganismo em 1859, e que, julgando que pertencesse ao género *Cercomonas*, o designou de *Cercomonas intestinalis* (Lambl, 1859). Desde então, diversas designações foram atribuídas ao organismo, sendo Kofoed e Christiansen (1915), os primeiros a propor o nome de *G. lamblia*, que se tem mantido, sem total acordo, até aos dias de hoje. Contudo, apenas em meados das décadas de 1960 e 1970 é que se começou a reconhecer a sua importância clínica, ao ser observado nas fezes de um grande número de indivíduos norte americanos sintomáticos que haviam viajado até à ex-União Soviética (Brodsky *et al.*, 1974) e por ter sido identificado como o agente causador de diferentes epidemias diarreicas de origem aquática na Europa e nos Estados Unidos da América (Moore *et al.*, 1969; Craun, 1986; Jephcott *et al.*, 1986). Em 1981, a Organização Mundial de Saúde (OMS) acrescentou finalmente *Giardia* à sua lista de parasitas patogénicos (WHO, 1981).

Com uma dispersão a nível global bastante significativa, estima-se que *G. lamblia* provoque cerca de 280 milhões de infecções em cada ano (Lane & Loyd, 2002), assegurando deste modo o estatuto de parasita intestinal humano mais comum em países desenvolvidos. Nas regiões em vias de desenvolvimento, cerca de 200 milhões de pessoas têm giardíase sintomática, sendo reportados 500 mil novos casos por ano (WHO, 1996). A elevada prevalência deste microrganismo pode ser explicada pela sua alta infectividade, 10 a 100 quistos foram suficientes para infectar 100% dos elementos de um grupo de estudo (Rendtorff, 1954), aliada à alta excreção do parasita, que pode chegar a 10^9 quistos por dia durante meses (Danciger & Lopez, 1975). Para além disso, calcula-se que os estudos epidemiológicos apresentem valores mais baixos que os reais, dada a existência de portadores assintomáticos, o facto de nem todos os sintomáticos procurarem

assistência médica e pelo facto de nem todos os médicos avançarem para exames laboratoriais em doentes com diarreias não sanguinolentas (Yoder & Beach, 2007).

G. lamblia é um microrganismo eucariótico, unicelular e flagelado que parasita o intestino humano, assim como o de alguns outros mamíferos, incluindo cães, gatos, roedores e animais de casco, mas também o de alguns répteis e aves (Thompson, 2004), provocando uma doença designada de giardíase, cujas manifestações clínicas incluem episódios de flatulência, cólicas intestinais, diarreia, perda de peso e produção de fezes líquidas e gordurosas. Anorexia, vômitos e aparecimento de muco ou sangue nas fezes são ocorrências mais raras (Gardner & Hill, 2001). A intensidade dos sintomas, assim como a gravidade da doença são surpreendentemente variáveis, observando-se quadros mais reservados em indivíduos imunodeprimidos e quadros moderados a ligeiros em imunocompetentes que conseguem, na grande maioria das vezes, resolver a infecção naturalmente sem necessitarem de qualquer tipo de tratamento. Contudo, reinfecções após curas espontâneas ou induzidas não são episódios raros. Por outro lado, as infecções assintomáticas são bastantes frequentes, contribuindo desta forma para a propagação do parasita (Adam, 1991). A análise cuidada da história clínica do paciente, que frequentemente inclui estadias recentes em zonas tropicais, contacto próximo com a natureza ou situações relacionadas com condições higiénicas deficientes, aliadas a um quadro de longa duração dos sintomas e a perda de peso, permite distinguir uma giardíase de outros tipos de infecções gastrointestinais, de origem viral ou bacteriana (Gardner & Hill, 2001).

G. lamblia consegue sobreviver no meio ambiente e em alimentos, servindo-se todavia da água como o mais importante veículo de transmissão do parasita ao homem. Na verdade, o quisto deste parasita não é susceptível aos níveis actuais de cloro recomendados para a água de consumo humano e nelas consegue resistir durante cerca de 3 meses a 4°C (Meyer, 1990), o que faz com que o aparecimento de surtos seja possível, mesmo em águas com níveis aceitáveis de coliformes fecais (Craun, 1986). Outro modo importante de disseminação do

microrganismo é através da via fecal-oral, muito frequente em indivíduos que exercem actividades que envolvem um contacto próximo com a natureza (Holtan, 1988) e em locais de grande densidade e proximidade inter-pessoal, tais como em lares de terceira idade e em infantários (Black *et al.*, 1977). Actos homossexuais praticados entre indivíduos masculinos também foram identificados como uma importante via de transmissão do parasita (Schmerin *et al.*, 1978). A transmissão através dos alimentos, quase sempre associada a produtos não cozinhados e manipulados com águas contaminadas, não é muito habitual apesar de detectada ocasionalmente (Smith *et al.*, 2007).

As discussões acerca das afinidades filogenéticas de *Giardia* têm sido motivo de controvérsia durante anos. Contudo, há actualmente um certo consenso acerca das suas origens primitivas. À luz dos novos avanços ocorridos nesta matéria, é hoje considerado um descendente da família dos primeiros eucariotas, tendo sofrido um processo de divergência evolucionar antes do extraordinário fenómeno da aquisição mitocondrial (Simpson *et al.*, 2002). Com uma organização intracelular muito simples, sem mitocôndrias nem peroxissomas mas com um sistema secretório vesicular primitivo que foi proposto como o antepassado do complexo de Golgi dos organismos superiores (Marti *et al.*, 2003a,b), *Giardia* tornou-se num organismo chave para aqueles que estudam a origem e os mecanismos de evolução das células eucariotas.

2. Morfologia e ciclo de vida

Com um ciclo de vida relativamente simples, *G. lamblia* adquire duas formas morfológicas distintas, o quisto ou forma infectante e o trofozoíto ou forma vegetativa.

O trofozoíto de *G. lamblia* coloniza a mucosa do intestino delgado, tem uma morfologia característica, bilateralmente simétrica, semelhante a uma pêra e mede aproximadamente 12 a 15 μm de comprimento e 5 a 9 μm de largura (Figura 1). O citoesqueleto é composto pelos corpos medianos, quatro pares de flagelos e um disco ventral (também denominado de disco de sucção ou disco

estriado) (Figura 1). O trofozoíto apresenta também dois núcleos anteriores, aparentemente idênticos e sem nucléolos, simétricos em relação ao eixo longitudinal. Vacúolos lisossomais, grânulos ribossomais e de glicogénio são encontrados no citoplasma. Os complexos de Golgi são visíveis durante o processo de enquistamento mas a sua presença ainda não foi confirmada em trofozoítos (Adam, 1991; Gillin *et al.*, 1996; Adam, 2001).

O corpo mediano é uma estrutura localizada na linha média do citoesqueleto. É uma estrutura única de *Giardia* spp. e a sua morfologia foi o primeiro parâmetro a ser usado no processo de distinção das diferentes espécies. O trofozoíto de *G. lamblia* contem, normalmente, dois corpos medianos cuja morfologia faz lembrar as orelhas de um martelo. As suas funções ainda constituem uma área pouco esclarecida, mas a afinidade dos anticorpos anti*giardina* e anti*tubulina* para os corpos medianos sugerem que este possa estar funcionalmente relacionado com o disco ventral (Piva & Benchimol, 2004).

Os quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral) (Figura 1) emergem dos corpos basais, perto da linha média do citoesqueleto. Nove pares de microtúbulos estão simetricamente enrolados na zona externa de cada flagelo enquanto dois microtúbulos preenchem o seu interior. As funções dos flagelos ainda não estão totalmente esclarecidas, estando no entanto relacionadas com a mobilidade do parasita e com o processo de adesão às células intestinais (Adam, 1991). O aparecimento precoce dos flagelos durante o enquistamento pressupõe que estes devem desempenhar algum papel dentro desse processo (Buchel *et al.*, 1987).

O disco ventral é uma estrutura essencial para a sobrevivência de *G. lamblia*, assegurando a aderência do parasita aos enterócitos, permitindo a obtenção dos nutrientes essenciais e evitando a expulsão do parasita do hospedeiro (Erlandsen & Chase, 1974). Tem uma estrutura côncava com uma profundidade máxima de 0,4 μm e ocupa cerca de dois terços da superfície ventral do trofozoíto. A borda do disco é suficientemente robusta e é ela que estabelece contacto com a superfície intestinal, sendo circundada por uma orla ventrolateral mais flexível (Holberton, 1973). O disco ventral é composto por microtúbulos (que contêm tubulinas), pontes cruzadas e microbandas (que contêm giardinas), estruturas

estas exclusivas de *G. lamblia* e que se encontram perpendiculares aos microtúbulos e às pontes cruzadas (Peattie *et al.*, 1989; Adam, 2001). As giardinas constituem uma família de proteínas únicas de *Giardia* spp., apenas encontradas no disco ventral e com um tamanho que varia de 29 a 38 kDa. Diversas giardinas foram já clonadas, α_1 -giardina (Peattie *et al.*, 1989), α_2 -giardina (Alonso & Peattie, 1992), β -giardina (Holberton *et al.*, 1988) e γ -giardina (Nohria *et al.*, 1992) e as suas sequências confirmaram a estrutura em alfa hélice destas proteínas. Para além destas estruturas, o disco ventral é rico em proteínas contrácteis, tais como actina, α -actina, miosina e tropomiosina, que constituem o suporte bioquímico para a contracção do disco, essencial para o processo de aderência (Feely *et al.*, 1982). A adesão é dependente do metabolismo activo, sendo inibido por altas concentrações de oxigénio, temperaturas abaixo dos 37°C, baixas concentrações de cisteína (Gillin & Diamond, 1981; Gillin & Reiner, 1982) e também pela acção de determinados fármacos (Katelaris *et al.*, 1994).

O trofozoíto de *G. lamblia* possui dois núcleos simétricos aparentemente idênticos. A membrana nuclear está parcialmente revestida por ribossomas e ainda não houve evidências da existência de nucléolos no seu interior (Adam, 1991). É genericamente aceite que a replicação ocorre nos dois em simultâneo (Wiesehahn *et al.*, 1984), sendo ambos transcrionalmente activos e com aproximadamente o mesmo número de genes de RNA ribossómico (rRNA). Aparentemente têm a mesma quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) e o mesmo tipo de genes e cromossomas (Kabnick & Peattie, 1990). Contudo, estes pressupostos ainda não estão bem esclarecidos, surgindo cada vez mais dados que defendem uma maior heterogeneidade entre as duas estruturas. Dados recentes apontam para diferenças em relação ao número e tamanho dos cromossomas em núcleos da mesma célula (Tůmová *et al.*, 2007), ajudando a entender os mecanismos de que os trofozoítos se servem para evitar que uma célula (mãe ou filha), após a fissão binária, fique com duas cópias do mesmo núcleo (Ghosh *et al.*, 2001).

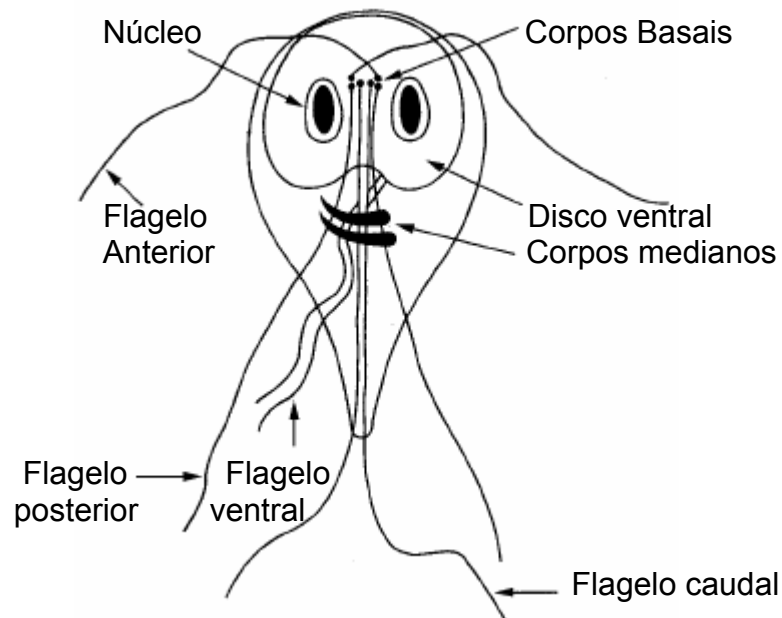


Figura 1 – Representação esquemática de um trofozoíto de *G. lamblia* (adaptado de Faubert, 2000).

O quisto é a forma infectante de *G. lamblia*. É resistente ao ambiente externo, protegendo-se da lise em ambientes hipotônicos, assim como dos ácidos gástricos produzidos pelo estômago do hospedeiro que parasita (Gillin *et al.*, 1996; Adam, 2001). Com uma capacidade de sobrevivência no meio ambiente considerável, o quisto tem uma actividade respiratória equivalente a apenas 10 a 20% daquela exercida pelos trofozoítos (Paget *et al.*, 1989). O processo de enquistamento dá origem a uma estrutura tetranucleada com uma forma ligeiramente oval. Os quistos medem entre 5 a 10 μm de diâmetro, sendo revestidos por uma parede celular com 0,3 a 0,5 μm de espessura, composta por uma camada externa filamentosa e uma camada membranosa interna composta por duas membranas (Adam, 1991; Adam, 2001). A parede celular é composta por três proteínas estruturais principais (Luján *et al.*, 1995; Mowatt *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2003), para além da galactosamina, o açúcar predominante na sua superfície (Jarroll *et al.*, 1989).

Durante o seu ciclo de vida, *G. lamblia* adquire duas formas distintas anteriormente descritas, o trofozoíto e o quisto (Figura 2). O quisto, considerado a forma infectante, é ingerido através dos alimentos e águas contaminadas ou mesmo directamente através da via fecal-oral. Depois de entrar no organismo do hospedeiro, inicia o processo de desinquistamento. Esta etapa começa depois do microrganismo entrar em contacto com os componentes ácidos do suco gástrico e é caracterizado por uma sequência complexa e coordenada de eventos que dão origem a dois trofozoítos (Bingham & Meyer, 1979; Hetsko *et al.*, 1998), dependente da activação de uma protease específica do parasita (Ward *et al.*, 1997). Os trofozoítos recém produzidos infectam o duodeno e a porção superior do intestino delgado, regiões com um pH alcalino favorável, reproduzindo-se por divisão binária e dando início às alterações clínicas características associadas à *G. lamblia*. À medida que os trofozoítos vão passando do intestino delgado para o cólon, são sujeitos a estímulos que conduzem à enquistação. Este processo pode ser reproduzido *in vitro*, submetendo os trofozoítos a meios com concentrações reduzidas de colesterol e sais biliares ou com concentrações crescentes de bÍlis a pH alcalino (Luján *et al.*, 1997). As proteínas necessárias para a formação da parede do quisto são então sintetizadas, resultado de um processo de transcrição génica altamente regulado, sendo posteriormente transportadas dando origem à estrutura final num processo que decorre entre 14 e 16 horas (Erlandsen *et al.*, 1995; Luján *et al.*, 1997). A larga maioria dos quistos produzidos, assim como alguns trofozoítos, são transportados através do intestino e expelidos com as fezes (Figura 2). No meio ambiente, os quistos conseguem sobreviver durante meses na água ou em ambientes húmidos, podendo dar início a um novo ciclo se ingeridos por um hospedeiro apropriado (Meyer, 1990; Gardner & Hill, 2001).

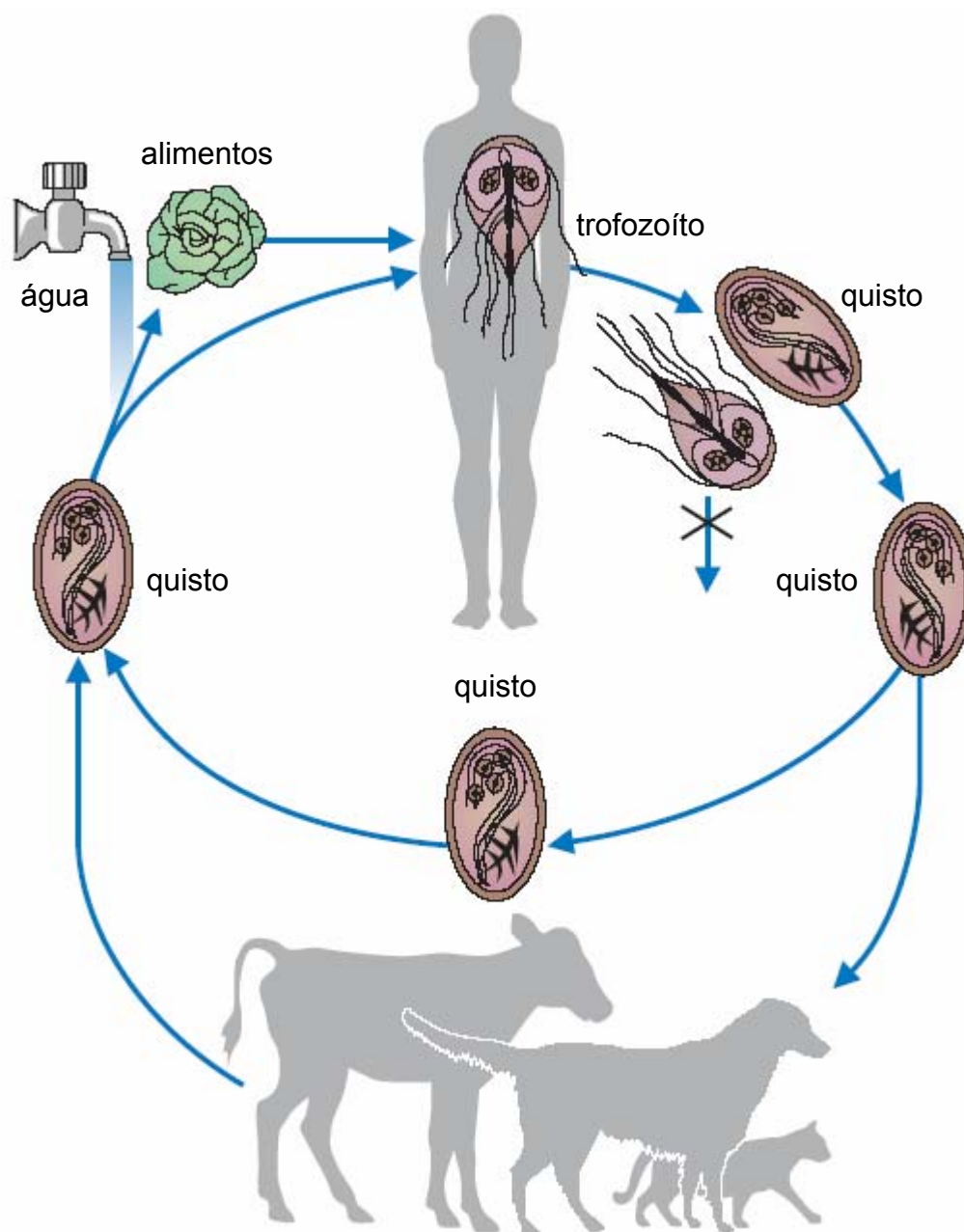


Figura 2 – Ciclo de vida de *G. lamblia*. Os alimentos e águas contaminadas com o parasita são a principal via de transmissão. Depois de se multiplicar no intestino do hospedeiro, o parasita é excretado através das fezes sob a forma de quistos e trofozoítos. Os trofozoítos não sobrevivem no meio ambiente e os quistos, mais resistentes, podem depois vir a infectar outros humanos e/ou determinadas espécies de animais (adaptado de Kayser *et al.*, 2005).

3. Nomenclatura de *Giardia*

Os isolados do género *Giardia* foram inicialmente classificados em função do hospedeiro de origem o que levou à criação de mais de 50 espécies diferentes. Contudo, este conceito foi rejeitado por Felice (1952) tendo sido propostos somente três espécies (*G. agilis*, *G. muris* e *G. duodenalis*) com base nas características morfológicas observadas por microscopia óptica. *G. agilis* infecta anfíbios e tem um trofozoíto longo e esguio, com corpos medianos em forma de lágrima dispostos quase paralelamente ao axostilo longitudinal. A espécie *G. muris* infecta os roedores e caracteriza-se pela produção de trofozoítos pequenos e ligeiramente arredondados, com corpos medianos pequenos e cilíndricos. Os trofozoítos de *G. lamblia* parasitam os mamíferos, incluindo o homem, pássaros e répteis e possuem a forma de uma pêra, com corpos medianos no centro da célula em posição transversal e em forma de orelhas de martelo. Posteriormente, graças ao contributo da microscopia electrónica, foram detectadas algumas diferenças morfológicas que levaram à inclusão de novas espécies, cujos isolados eram anteriormente classificados como *G. lamblia*: *G. ardeae* e *G. psittaci*, específicas de aves, e *G. microti* específica de roedores (Erlandsen & Bemrick, 1987; Feely, 1988; Erlandsen *et al.*, 1990; van Keulen *et al.*, 1998).

A espécie *G. lamblia* engloba organismos recolhidos de diferentes espécies de mamíferos. A uniformidade morfológica aparente desses isolados esconde, no entanto, uma diversidade genética considerável, que tem estado na base da dificuldade em estabelecer uma classificação taxonómica unânime e estável ao longo dos últimos anos (Monis *et al.*, 2003).

As primeiras classificações, baseadas nas características moleculares de *G. lamblia*, dividiram a espécie em três grupos (Nash *et al.*, 1985). Os grupos 1 e 2, muito próximos entre si, foram considerados análogos ao assemblage A de Mayrhofer (Mayrhofer *et al.*, 1995) e aos isolados Polacos de Homan (Homan *et al.*, (1992). Por outro lado, o grupo 3 de Nash (Nash *et al.*, 1985) corresponde ao assemblage B de Mayrhofer (Mayrhofer *et al.*, 1995) e aos isolados Belgas de Homan (Homan *et al.*, 1992).

Todos os isolados de *G. lamblia* de origem humana foram, até agora, classificados dentro dos assemblages A e B (Karanis & Ey, 1998; Cacciò *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2006), que por sua vez podem ser subdivididos, através da aplicação de técnicas moleculares baseadas na acção de enzimas de restrição, em grupos mais específicos: A-I, A-II, B-III e B-IV (Monis *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2000; Monis & Thompson, 2003; Monis *et al.*, 2003; Read *et al.*, 2004). O sub-assemblage A-I está amplamente distribuído e uma vez que tem vindo a ser isolado de amostras de origem humana e animal (cães, gatos, castores, animais de casco) é considerado um grupo com grande potencial zoonótico. Por outro lado, o sub-assemblage A-II parece ser específico dos humanos, assim como o assemblage B, apesar de já se terem identificado isolados pertencentes a este último grupo em animais (Monis & Thompson, 2003; Thompson, 2004).

A análise de sequências genéticas possibilitou a identificação de cinco novos assemblages, específicos de diferentes grupos de animais. Os assemblages C e D são considerados específicos dos cães, embora já tenham sido identificados em gatos (Hopkins *et al.*, 1997; Monis *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2000; McGlade *et al.*, 2003). O assemblage E parece ser específico de animais de casco (Ey *et al.*, 1997; Mendonça *et al.*, 2007) e os assemblages F e G são específicos de gatos e ratos, respectivamente (Monis *et al.*, 1999).

Estudos recentes, baseados na análise de sequências genéticas, possibilitaram a diferenciação de grupos ainda mais específicos, denominados de genótipos, dentro dos diversos sub-assemblages. Deste modo, o sub-assemblage A-I engloba os genótipos A1 e A5, enquanto que o sub-assemblage A-II engloba os genótipos A2 e A3, entre outros (Cacciò *et al.*, 2008).

4. Patologia e patogénese

A patofisiologia de *Giardia* é um processo complexo que tem vindo a ser gradualmente esclarecido ao longo dos últimos anos, graças à realização de alguns estudos que têm oferecido informações valiosas acerca da diversidade de

processos que são desencadeados como consequência de uma infecção por *Giardia* (Thompson, 2004).

Nos indivíduos assintomáticos, os estudos histológicos das mucosas do jejuno e do duodeno não costumam apresentar modificações significativas. Contudo, em indivíduos sintomáticos, as alterações incluem atrofia das vilosidades intestinais, hiperplasia das criptas, danos nas células epiteliais e infiltração leucocitária acentuada da *Lamina propria*. Contudo, a invasão da mucosa e submucosa é um acontecimento raro (Brandborg *et al.*, 1967). Biopsias intestinais revelam uma vasta distribuição dos parasitas ao longo das vilosidades e dos espaços interviloidais, com um arredondamento da barreira microviloidal das células epiteliais. No entanto, doentes sintomáticos podem apresentar uma histologia normal do jejuno, sem exsudado inflamatório (Brandborg *et al.*, 1967).

A alteração da permeabilidade da membrana epitelial intestinal é, de facto, uma das alterações mais importantes da infecção por *Giardia*, parecendo resultar de efeitos citopáticos directos induzidos por substâncias produzidas pelo parasita (Buret *et al.*, 2002). Glicoproteínas (Kaur *et al.*, 2001), proteinases (Jimenez *et al.*, 2000) e lectinas (Gardner & Hill, 2001), são algumas das substâncias citopáticas conhecidas que parecem causar danos directos na mucosa intestinal. Neste processo, as membranas periféricas que desempenham um papel importante na regulação da permeabilidade epitelial, em particular a zónula ocludina-1, aparecem desagregadas. O consequente aumento da permeabilidade epitelial tem como consequência uma resposta inflamatória e alterações digestivas ao nível da absorção intestinal. Estas alterações estão correlacionadas com as lesões da barreira estriada e com a diminuição da actividade das dissacaridases (Scott *et al.*, 2002). De salientar, ainda, que as alterações na permeabilidade epitelial podem resultar numa maior expressão de antigénios no lúmen, que pode exacerbar a ocorrência de alterações alérgicas, frequentemente reportadas em humanos infectados com *Giardia* (Scott *et al.*, 2002). A gravidade da doença está dependente dos factores de virulência do parasita bem como do nível nutricional, imunológico e de desenvolvimento do hospedeiro (Chin *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002).

Normalmente, no decorrer da infecção, os trofozoítos não penetram no epitélio, não invadem tecidos adjacentes nem entram na corrente sanguínea, mantendo-se a infecção restrita ao lúmen intestinal do hospedeiro parasitado (Faubert, 2000).

Alguns estados imunológicos parecem predispor à infecção por *Giardia*. De facto, indivíduos hipogamaglobinémicos parecem ter uma maior incidência de giardíase e apresentam sintomatologia mais grave, particularmente os que têm défices de produção de Imunoglobulina A (IgA) (Faubert, 2000; Langford *et al.*, 2002). A Imunodeficiência Comum Variável também aumenta o risco de desenvolvimento da giardíase crónica sintomática (Katz & Taylor, 2001; Onbaşı *et al.*, 2005), enquanto que os doentes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana não parecem ter uma maior susceptibilidade para contrair a infecção (Faubert, 2000).

As defesas do hospedeiro induzidas durante uma infecção por *Giardia* podem ser classificadas dentro de duas grandes categorias, nomeadamente as respostas imunológicas e as respostas não-imunes ou naturais.

O organismo humano possui alguns mecanismos não-imunes capazes de responder atempadamente a infecções por trofozoítos de *Giardia*. Entre eles, destacam-se a camada mucosa protectora do intestino, composta essencialmente por água, imunoglobulinas e mucinas, que lhe confere uma textura gelatinosa que dificulta a adesão dos parasitas (Satchithanandam *et al.*, 1990), o óxido nítrico produzido pelos enterócitos, que é um conhecido inibidor de crescimento de diversos microrganismos patogénicos (Eckmann *et al.*, 2000), e as defensinas, pequenos péptidos libertados pelas células epiteliais intestinais, capazes de se ligar e desse modo danificar a membrana de microrganismos patogénicos (Aley *et al.*, 1994). Foi também reconhecida uma capacidade anti-*Giardia* no leite humano materno, correlacionada com a presença de sais biliais conjugados (Gillin, 1987), ácidos gordos insaturados (Rohrer *et al.*, 1986) e ácidos gordos livres (Reiner *et al.*, 1986) na sua composição.

É amplamente aceite pela comunidade científica que as duas principais linhas de defesa imunológica, humoral e celular, intervêm na resposta à infecção por *Giardia*. Contudo, os exactos mecanismos através dos quais o sistema imune

interage com o parasita ainda não estão completamente esclarecidos (Abdul-Wahid & Faubert, 2007). As Imunoglobulinas A (IgA), G (IgG) e M (IgM) anti-*Giardia* produzidas pelo hospedeiro são importantes no processo, estando directamente correlacionadas com a erradicação do parasita (Daniels & Belosevic, 1994; Faubert, 2000; Langford *et al.*, 2002). De facto, ratos com deficiências nas células B, ou incapazes de as produzir, não conseguiram desencadear uma resposta competente a infecções por *Giardia* (Snider *et al.*, 1985; Snider & Underdown, 1988; Stäger & Müller, 1997), sugerindo que a linha de defesa humoral é importante durante a resposta à infecção. Em contraste, outros estudos sugerem que as células B desempenham apenas um papel limitado neste processo e que as defesas independentes das células B desempenham um papel importante no controlo e eliminação da infecção (Lai & Mayer, 1997; Singer & Nash, 2000). De facto, respostas imunológicas mediadas pelas células T têm vindo a ser associadas a diversas patologias intestinais idiopáticas e microbianas. Estudos realizados, utilizando modelos animais atímicos, comprovaram que muitas das alterações epiteliais intestinais observadas durante a infecção por *Giardia* eram de facto dependentes das células T (Scott *et al.*, 2000; Singer & Nash, 2000; Scott *et al.*, 2004). A diminuição da área de superfície da barreira estriada, a redução da actividade das dissacaridases e as alterações morfológicas observadas nas vilosidades e criptas intestinais foram mediadas por células T CD8⁺, enquanto que a regulação do influxo de linfócitos intraepiteliais foi promovida pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Scott *et al.*, 2004).

5. Potencial zoonótico

Actualmente é aceite que algumas espécies de *Giardia* são específicas de determinados hospedeiros, enquanto que outras parecem ter uma dispersão mais ubíqua pela natureza. Contudo, os estudos experimentais realizados na tentativa de abordar as infecções cruzadas têm sido caracterizados por algumas limitações, nomeadamente na dificuldade em observar o parasita em hospedeiros com baixa excreção de quistos (Traub *et al.*, 2004), na utilização de isolados não

identificados ao nível genético (McDonnell *et al.*, 2003) e na dificuldade interpretativa resultante da diversidade genética dos isolados escolhidos, das diferenças na viabilidade dos quistos utilizados, dos distintos estados imunitários dos hospedeiros envolvidos e das limitações das técnicas de detecção (Thompson, 2004).

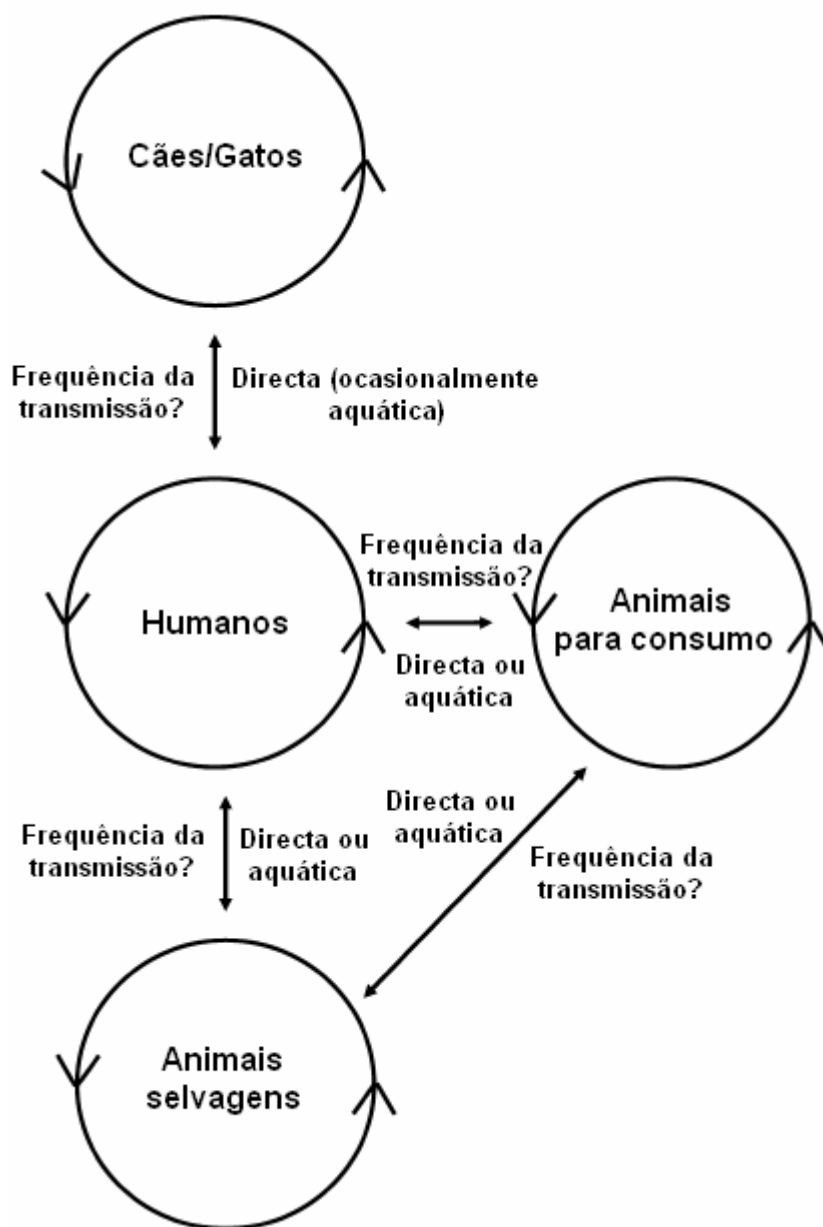


Figura 3 – Esquema representativo dos principais ciclos de transmissão de *G. lamblia* (adaptado de Thompson, 2004).

Do ponto de vista de saúde pública, e tal como já foi referido anteriormente, os grupos genéticos de maior risco zoonótico na *G. lamblia* são o assemblage A, principalmente o sub-assemblage A-I, e em menor extensão o assemblage B (Thompson, 2004). Contudo, a dispersão dos assemblages semelhantes por diferentes hospedeiros não deve ser, por si só, considerada uma sólida evidência da ocorrência de transmissão zoonótica.

Tendo como base as prevalências de *Giardia* em diferentes hospedeiros e o conhecimento actual acerca dos principais grupos genéticos de *G. lamblia*, foram propostos quatro ciclos principais de transmissão, que mantêm o parasita em hospedeiros mamíferos (Figura 3) (Thompson, 2004).

Em ambientes propícios a elevadas taxas de frequência de transmissão do parasita, seria de esperar que as interacções competitivas se pudessem traduzir em vantagem para determinados assemblages em detrimento de outros, situação essa que parece não acontecer (Thompson, 2004). Exemplo disso é um estudo que examinou isolados de cães e humanos, que viviam em contacto próximo na mesma comunidade, que revelou que todos os isolados humanos pertenciam aos assemblages A e B, enquanto que os isolados caninos eram todos, com apenas uma excepção, dos assemblages C ou D (Hopkins *et al.*, 1997).

A análise da prevalência genética em humanos sintomáticos e assintomáticos tem vindo a revelar uma maior relação entre o assemblage A e quadros mais severos da doença, e entre o assemblage B e infecções assintomáticas (Homan & Mank, 1997; Read *et al.*, 2001; Amar *et al.*, 2002; Aydin *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2006; Sahagún *et al.*, 2008). De facto, a associação do assemblage B com portadores assintomáticos pode ser uma das razões que explica a elevada incidência deste assemblage em regiões desenvolvidas, uma vez que faz com que as infecções sejam mais difíceis de detectar, continuando a haver propagação do parasita através da comunidade. Por outro lado, os indivíduos infectados por parasitas do assemblage A são mais facilmente identificados e tratados, factor que pode contribuir para a diminuição da frequência deste assemblage entre humanos (Read *et al.*, 2001; Thompson, 2004).

As infecções por *Giardia* em animais de casco são de elevada importância, não só do ponto de vista clínico mas também económico (Olson *et al.*, 2004). De facto, *Giardia* tem vindo a ser apontada, isoladamente ou em combinação com outros microrganismos patogénicos, como um dos principais agentes etiológicos de diarreia em bezerros (Xiao & Herb, 1994; Huetink *et al.*, 2001; O'Handley & Olson, 2006). Os efeitos da giardíase crónica neste tipo de animais pode-se traduzir numa redução no ganho de peso, numa diminuição da eficiência da alimentação e numa diminuição do peso das carcaças, tal como foi comprovado em cordeiros infectados experimentalmente (Olson *et al.*, 1995).

Estudos de prevalência genética têm vindo a demonstrar que os animais de casco criados em pequenas e grandes explorações podem ser infectados por um de três diferentes assemblages de *G. lamblia*. Apesar do assemblage E surgir como o mais frequente, alguns estudos têm vindo a identificar pequenas e médias proporções de animais infectados com parasitas dos assemblages A e B, cuja potencial importância zoonótica é largamente reconhecida (O'Handley *et al.*, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2007; Coklin *et al.*, 2007; Langkjaer *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Trout *et al.*, 2007).

Alguns estudos relativamente recentes têm demonstrado que *G. lamblia* é um dos parasitas entéricos mais comuns em cães e gatos (Hackett & Lappin, 2003; McGlade *et al.*, 2003; Thompson & Robertson, 2003; Carlin *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2006). Contudo, estima-se que os valores de prevalência conhecidos sejam inferiores aos valores reais, reflexo da baixa sensibilidade dos métodos de detecção convencionais e à natureza intermitente da excreção dos quistos (Thompson, 2004). Os estudos epidemiológicos efectuados ao nível molecular demonstraram que os cães podem ser infectados pelos assemblages específicos, assim como pelos assemblages com potencial zoonótico (Abe *et al.*, 2003; Eligio-Garcia *et al.*, 2005; Itagaki *et al.*, 2005; Lalle *et al.*, 2005; Zygnier *et al.*, 2006; Leonhard *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007), verificando-se a mesma situação com os gatos (Fayer *et al.*, 2006; Papini *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007; Vasilopoulos *et al.*, 2007). Graças a estas evidências, o tratamento de cães e gatos infectados por *Giardia* é normalmente recomendado, independentemente da instalação ou não

da doença, com o objectivo de controlar a propagação do parasita (Thompson, 2004).

Apesar de os animais selvagens puderem estar susceptíveis a infecções com os denominados assemblages zoonóticos de *G. lamblia*, são poucas as evidências até agora obtidas que esclareçam esta situação. A caracterização molecular de uma população de marsupiais na Austrália mostrou que esses animais eram infectados por um genótipo distinto, até aí não identificado (Thompson, 2004). Também os roedores e as aves parecem ser preferencialmente infectadas por genótipos específicos, sem relevância zoonótica comprovada (McRoberts *et al.*, 1996; Monis & Thompson, 2003). Em todo o caso, infecções por assemblages zoonóticos foram já identificadas em diferentes tipos de animais selvagens (Moro *et al.*, 2003; Trout *et al.*, 2003; Itagaki *et al.*, 2005; Trout *et al.*, 2006; Hamnes *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007).

6. Diagnóstico

6.1. Observação microscópica de quistos e trofozoítos

O diagnóstico de *G. lamblia* pode ser feito por demonstração microscópica directa de quistos e/ou trofozoítos em amostras de fezes, ou de trofozoítos no líquido duodenal ou em biópsias da mucosa intestinal (Kulda & Nohýhová, 1995).

A demonstração de trofozoítos ou quistos nas fezes é o método tradicional de diagnóstico. O exame parasitológico de fezes realiza-se directamente a fresco ou após concentração (formol-éter-acetato, sulfato de zinco ou formol-éter-etílico). As amostras de fezes podem ter ou não preservantes como o formol a 10%, álcool polivinílico ou mertiolato-iodo-formaldeído.

Os quistos podem ser observados após coloração (trícromica ou hematoxilina-ferro) ou por técnicas de imunofluorescência directa com o uso de anticorpos monoclonais. Os quistos de *G. lamblia* apresentam-se ovais ou elipsóides, medindo aproximadamente 5-10 µm de comprimento. No interior do quisto, com

coloração amarela-acastanhada quando na presença de soluto de lugol e azul pela coloração de hematoxilina-ferro, encontram-se os quatro núcleos, quatro corpos medianos e os flagelos. Devido ao carácter intermitente da excreção de quistos, a sensibilidade do exame de uma única amostra de fezes situa-se entre os 35 e os 50%. A realização de técnicas de concentração e o estudo de três amostras, de preferência de dias alternados, aumenta a sensibilidade para 85 a 90%.

A presença de trofozoítos nas fezes é pouco frequente e está limitada a fezes diarreicas. Os trofozoítos são muito sensíveis às condições do meio exterior, desintegrando-se rapidamente. Em indivíduos com diarreia crónica e má absorção e com exame de fezes repetidamente negativos, apesar de se suspeitar de giardíase, pode ser necessário recorrer à pesquisa de trofozoítos no líquido duodenal ou em biópsia duodenal. Nos trofozoítos não corados, em preparações a fresco, pode-se observar a forma típica, o movimento irregular e ainda os flagelos.

6.2. Detecção de antígenos nas fezes

Os métodos de detecção de antígenos de *G. lamblia* nas fezes humanas são considerados métodos simples, específicos e sensíveis (Garcia *et al.*, 2003). Foram desenvolvidos diversos métodos imunológicos para detectar antígenos de *G. lamblia* nas fezes humanas nomeadamente a imuno-electroforese, com sensibilidade e especificidade de 90% e 95%, respectivamente e a imunofluorescência directa, que utiliza anticorpos monoclonais, com uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 98%. Actualmente, existem diversos ensaios imunoenzimáticos comercializados com uma especificidade superior a 99% (99,3-100%) e uma sensibilidade que varia entre 88,6% e 100%. Utilizam anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais.

Estes tipos de testes têm vindo a ser bastante utilizados para diagnóstico, porque não necessitam de profissionais altamente treinados, nem de equipamentos muito dispendiosos.

6.3. Detecção de *G. lamblia* em fezes por PCR

A aplicação da técnica de “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR) ao diagnóstico da giardíase a partir de amostras de fezes tem sido aplicada por vários autores utilizando vários oligonucleótidos que amplificam sequências específicas de determinados genes, tais como o gene da β -giardina, da triosefosfato isomerase (tpi), glutamato desidrogenase (gdh), factor de elongação 1- α ou da região intergénica do rRNA (Weiss, 1993; Ghosh *et al.*, 1993; Monis *et al.*, 1996; Cacciò *et al.*, 2002; McIntyre *et al.*, 2006)

A sensibilidade analítica para os diversos oligonucleótidos específicos de *G. lamblia* oscila num intervalo de 1 a 10 quistos por mistura de reacção e a maioria dos trabalhos realizados verificaram que a PCR é mais sensível que a microscopia óptica e as técnicas de imunocromatografia. Contudo, a sua utilização em laboratórios de rotina ainda está muito limitada, devido aos elevados custos que acarreta.

OBJECTIVOS

A distribuição genotípica de *G. lamblia* a nível global é algo heterogénea, observando-se o predomínio de determinados genótipos em algumas zonas (Minvielle *et al.*, 2008), enquanto que outros parecem ser mais frequentes noutras regiões (Souza *et al.*, 2007; Ravid *et al.*, 2007). Apesar da contribuição recente de alguns estudos, a informação acerca da distribuição genotípica de *G. lamblia* em Portugal é muito escassa (Almeida *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2007).

No presente trabalho, procurou-se determinar a taxa de prevalência de *G. lamblia* e fazer a caracterização genotípica de isolados de origem canina e humana recolhidos em Portugal. Através da comparação filogenética avaliou-se também o potencial zoonótico dos isolados caninos e a homologia entre os isolados de Portugal e os descritos noutros países.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Exame parasitológico de fezes

1.1. Colheita das amostras

Durante o período de Setembro de 2007 a Março de 2008 foram colhidas amostras de fezes de crianças (idades compreendidas entre os 4 meses e os 3 anos) que frequentavam uma creche da região norte do país e de cães (idades compreendidas entre os 3 meses e os 4 anos) residentes num canil municipal da mesma região. Durante a colheita das amostras dados relativos à idade, sexo e consistência das fezes foram registados. O consentimento dos responsáveis das crianças bem como dos animais foi devidamente assegurado.

As amostras foram armazenadas a 4°C sem preservantes e analisadas no intervalo de uma semana.

1.2. Detecção de antígenos de *G. lamblia* nas fezes

A detecção de antígenos de *G. lamblia* nas fezes foi realizada através do imunoensaio cromatográfico (*Simple Giardia*, Operon, s.a.). Este teste baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos de *G. lamblia* e detecta antígenos presentes tanto na forma de trofozoíto como na de quisto. O método utiliza anticorpos monoclonais anti-*G. lamblia* conjugados covalentemente a microsferas vermelhas de poliestireno. Também utiliza microsferas azuis como teste controlo. Os antígenos dos parasitas presentes nas fezes reagem com as partículas de látex revestidas com os anticorpos monoclonais específicos, formando um complexo de partículas de látex/anticorpos/antígenos do parasita que migra por um processo cromatográfico pela zona de reacção. Nesta zona há anticorpos anti-*G. lamblia* que reagem com o complexo, originando a formação de uma linha vermelha.

O método foi realizado segundo as instruções do fabricante. Assim, uma pequena quantidade de fezes (30 a 50 mg de fezes sólidas ou 100 μ L de fezes líquidas) foi misturada no tampão e agitada vigorosamente (Figura 4-a). Deixou-se a repousar durante uns minutos, de forma a eliminar as partículas sólidas em suspensão, e aplicaram-se 4 a 5 gotas da solução tampão/amostra na placa de reacção (Figura 4-b). Após 5 minutos efectuou-se a leitura e interpretação dos resultados. O aparecimento de uma linha vermelha e de uma linha azul na zona dos resultados é considerado um resultado positivo a *G. lamblia* (Figura 4-c). O aparecimento de apenas uma linha azul alinhada com o C (controlo) é considerado negativo a antígenos de *G. lamblia*. Os resultados que não coincidam com os descritos anteriormente devem ser considerados inválidos.

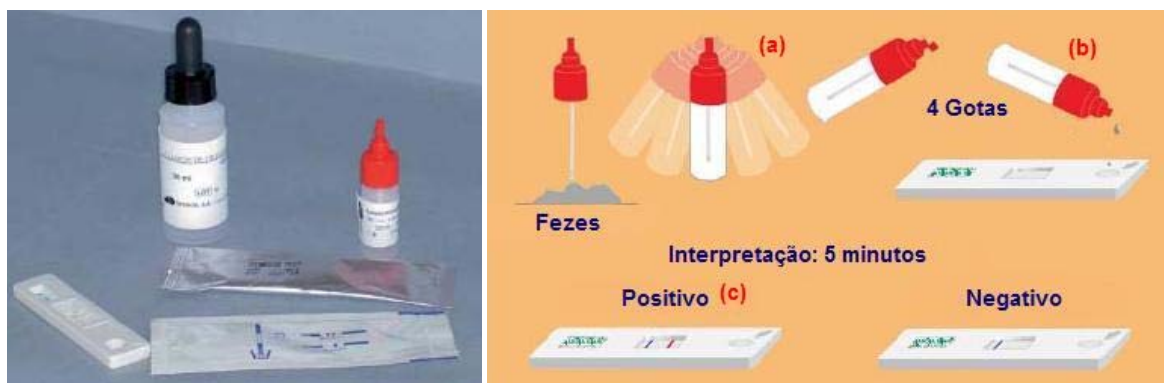


Figura 4 – Detecção de antígenos de *G. lamblia* pelo método imunocromatográfico (*Simple Giardia*, Operon, s.a.).

1.3. Exame microscópico após concentração das amostras

As amostras de fezes foram submetidas a um processo de concentração de parasitas através de um kit comercial (*Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.*). Este método permite concentrar estruturas parasitárias de protozoários e helmintas.

O método foi realizado segundo as instruções do fabricante. Assim, homogeneizaram-se as fezes no tampão acondicionado em frasco próprio (Figura 5-a). A quantidade de fezes utilizada foi a necessária para que o líquido de fixação alcançasse um nível indicado. A mistura foi agitada vigorosamente num

vórtex até que as fezes se dissolvessem adequadamente. Após 30 minutos à temperatura ambiente, transferiu-se a mistura para um tubo cônico, fazendo-a atravessar um filtro específico (Figura 5-b) adaptável ao frasco do fixador. Depois da mistura estar completamente filtrada adicionaram-se 2 mL de éter etílico e agitou-se vigorosamente num vórtex durante pelo menos 30 segundos. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 500 rpm durante 10 minutos e rejeitaram-se as 3 camadas do sobrenadante (camada etérea, camada de detritos e camada aquosa). As paredes dos tubos foram limpas com zaragatoas (Figura 5-c) e ao sedimento adicionaram-se duas a três gotas de formol a 10%. A observação microscópica dos sedimentos em determinadas amostras foi imediata e noutras foi realizada após armazenamento a 4°C.



Figura 5 – Método de concentração de amostras fecais (*Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.*).
a – frasco com solução fixadora; b – filtro de rede; c – zaragatoas; d – tubo cónico.

A observação microscópica dos sedimentos foi realizada por microscopia óptica recorrendo ao microscópio *Eclipse E400 (Nikon)* acoplado a uma câmara digital DN100 (*Nikon*). Assim, fez-se uma preparação entre lâmina e lamela com uma gota do sedimento e uma gota de soluto de lugol. O iodo presente no soluto de lugol cora os quistos dos protozoários facilitando a sua observação. A preparação foi primeiro analisada com uma ampliação de x100 de forma a observar os ovos de helmintas, e depois com uma ampliação de x400 para a identificação de quistos de protozoários.

2. Concentração de quistos de *G. lamblia* por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Algumas amostras de fezes, nas quais a extracção de DNA directa não foi eficaz, foram submetidas a um processo de concentração de quistos de *Giardia*. A metodologia aplicada foi a concentração por centrifugação em gradiente de densidade de sacarose (Roberts-Thomson *et al.*, 1976) com alterações introduzidas por Bingham *et al.* (1979). Assim, uma alíquota de fezes foi suspensa em água destilada, tamizada por um passador de rede e centrifugada a 400 rpm durante 5 minutos. De seguida, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi lavado duas vezes com água. Posteriormente, o sedimento lavado foi homogeneizado em 5 mL de água e foi aplicado sobre 3 mL de sacarose 1 M a 4°C (Anexo I), em tubo de centrífuga cónico de 15 mL de capacidade. Após centrifugação a 600 rpm durante 5 minutos, a interfase água/sacarose foi recolhida, diluída 1:10 com água e centrifugada a 400 rpm durante 5 minutos. No final, ressuspendeu-se o sedimento com os quistos em água destilada e armazenaram-se a -20°C.

3. Estudo molecular

3.1 Extracção de DNA

A extracção de DNA genómico foi efectuada directamente em fezes totais de origem humana e animal positivas a *G. lamblia* (por detecção de antígenos e/ou observação de quistos após concentração), em amostras de quistos de *G. lamblia* concentrados pelo método da sacarose e em culturas de trofozoítos axenizados.

3.1.1. Extracção de DNA a partir de amostras fecais e de quistos concentrados por centrifugação em gradiente de densidade

A caracterização genotípica de *G. lamblia*, quando realizada directamente a partir das fezes e de quistos, tem demonstrado que os métodos de extracção tradicionalmente usados não são eficientes. A extracção insuficiente de DNA, a co-purificação de inibidores de PCR, a presença de alvos não específicos e a degradação do DNA durante o armazenamento dos quistos são alguns dos factores responsáveis pela ineficácia dos processos. Assim, recorreu-se ao kit *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) baseado no método de extracção por colunas de sílica de troca aniónica, que garante a eliminação de substâncias inibitórias e com capacidade de degradar o DNA.

Num tubo de 2 mL adicionou-se cerca de 220 mg de fezes a 1,4 mL de tampão *ASL*, misturou-se no vórtex e incubou-se durante 30 minutos a 90°C. Posteriormente, centrifugou-se a mistura durante 1 minuto a 14000 rpm, retirou-se 1,2 mL do sobrenadante para um novo tubo de 2 mL, adicionou-se uma pastilha de *InhibitEX*, agitando no vórtex durante 1 minuto e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. No fim da incubação submeteu-se a uma centrifugação durante 3 minutos a 14000 rpm, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e submeteu-se novamente a uma centrifugação. De seguida, transferiu-se 200 µL do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL com 15 µL de proteinase K, adicionando-se também 200 µL de Tampão *AL*. Esta solução foi homogeneizada e incubada a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, o tubo é sujeito a centrifugação a 14000 rpm durante 10 segundos para remover algumas gotas que possam estar nas paredes interiores e na tampa do tubo. À mistura adicionou-se 200 µL de etanol a 99% e, depois de uma ligeira mistura no vórtex, centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 segundos. O lisado foi transferido para a microcoluna depositada num tubo colector de 2 mL e centrifugou-se a 14000 rpm durante 1 minuto. O filtrado foi desprezado, colocou-se a coluna num novo tubo colector, adicionou-se 500 µL de tampão *AW1* e centrifugou-se a 14000 rpm durante 1 minuto. Esta operação foi repetida com o tampão *AW2* e no final a microcoluna foi colocada num tubo de 1,5 mL à qual se

adicionou 100 μ L de tampão *AE* e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. A matriz foi sedimentada por centrifugação a 14000 rpm durante 1 minuto. O eluído, que contém o DNA, foi conservada a uma temperatura de -20°C.

3.1.2. Extração de DNA a partir de culturas de trofozoítos axenizados

Para a extração do DNA dos trofozoítos foram usadas culturas em fase exponencial tardia de 18 isolados humanos axenizados de *G. lamblia* (Sousa & Poiares da Silva, 2004). Os meios de cultura foram rejeitados e os trofozoítos aderentes foram recolhidos após incubação em banho de gelo durante 15 minutos com tampão PBS a 4°C. Posteriormente, os trofozoítos foram lavados duas vezes com o tampão PBS e centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento obtido em 200 μ L de tampão *TE*, 400 μ L de tampão de lise (*TritonX*-100 8%, sacarose 0,25 M, EDTA 50 mM, pH 8,0) e 50 μ L de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram agitadas no vórtex e incubadas a 50°C durante 2 a 3 horas. O DNA foi extraído e purificado a partir do lisado utilizando-se o Kit *Prep-A-Gene DNA purification* (*Bio-Rad, Richmond, U.S.A.*) segundo as instruções do fabricante. Assim, 300 μ L do lisado foram transferidos para tubos de 1,5 mL e adicionou-se 1 mL de tampão de ligação (perclorato de sódio 6 mM, Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0), 25 μ L de matriz e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos sob agitação. A matriz foi sedimentada por centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto e o sobrenadante foi removido por aspiração. O sedimento foi lavado com 625 μ L de tampão de ligação e após agitação no vórtex foi novamente submetido a centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto. A matriz foi lavada duas vezes com uma mistura de tampão de lavagem (Tris 40 mM, NaCl 800 mM, EDTA 4 mM, pH 7,5) e etanol 95-100% (1:1). Após centrifugação, removeram-se cuidadosamente todos os vestígios de líquido do tubo. Ressuspendeu-se o sedimento em 60 μ L de tampão *TE* e incubou-se a 47°C durante 5 minutos. A matriz foi sedimentada por centrifugação a 13000 rpm durante um minuto e o sobrenadante, que contém o DNA, foi novamente

submetido a outra centrifugação para remover quaisquer vestígios de matriz. O sobrenadante contendo o DNA purificado foi recolhido e congelado a -20°C.

3.2. Amplificação de DNA do gene da β -giardina por PCR

A amplificação de fragmentos de DNA específicos do gene da β -giardina foi realizada através de duas reacções de PCR, nomeadamente um *nested* PCR¹ descrito por Lalle *et al.* (2005) e um *semi-nested* PCR² descrito por Cacciò *et al.* (2002).

Para os dois protocolos a primeira reacção é comum e o produto de amplificação formado é posteriormente usado em dois segundos PCR distintos. Os produtos obtidos no *nested* PCR foram submetidos a restrição enzimática (RFLP) e/ou sequenciados e os produtos de *semi-nested* PCR foram submetidos a sequenciação.

As reacções de amplificação de DNA foram realizadas recorrendo a uma mistura de reacção comercializada que combina, nas proporções adequadas, os reagentes necessários à técnica (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, tampão e DNA polimerase), com a excepção dos oligonucleótidos iniciadores.

Em cada reacção utilizaram-se 42 μ L da mistura *PCR SuperMix (Invitrogen)* e 2,5 μ L de cada oligonucleótido iniciador (para uma concentração final de aproximadamente 0,5 μ M). Nas amostras de DNA extraídas a partir das culturas axenizadas ou dos quistos concentrados usaram-se 2 μ L de DNA, enquanto que nas amostras de DNA extraídas directamente a partir das fezes totais usaram-se 4 μ L.

Nas segundas reacções, do *nested* PCR e *semi-nested* PCR, usaram-se 2 μ L de produto de amplificação proveniente da primeira reacção.

¹ Técnica de PCR onde a amplificação da sequência alvo é realizada a partir do produto de uma reacção inicial independente. A aplicação desta técnica de PCR permite melhorar a especificidade e eficiência da reacção.

² Variante do *nested* PCR onde um dos oligonucleótidos da segunda reacção é igual a um dos oligonucleótidos utilizados na reacção inicial.

Para a reacção de amplificação inicial, comum ao *nested* PCR e *semi-nested* PCR, foram utilizados os oligonucleótidos G7 e G759 (Tabela I) obtendo-se fragmentos com 752 pares de bases (pb). Para a amplificação deste produto usou-se um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de amplificação a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, seguidos de um extensão final de 7 minutos a 72°C (Tabela II).

Tabela I – Oligonucleótidos sintéticos usados nas reacções de PCR para amplificação de fragmentos de 384 pb e 511 pb do gene da β -giardina, segundo Cacciò *et al.* (2002) e Lalle *et al.* (2005), respectivamente.

Oligonucleótidos iniciadores	Sequência
G7	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCA GTGC-3'
G759	5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'
G376	5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3'
G2005F	5'-GAACGAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'
G2005R	5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'

Na segunda reacção de amplificação do *semi-nested* PCR foram utilizados os oligonucleótidos G376 e G759 (Tabela I) amplificando-se fragmentos de 383 pb. As condições de amplificação foram as mesmas da reacção de amplificação inicial (Tabela II).

Tabela II – Condições das reacções de PCR para amplificação de fragmentos específicos do gene da β -giardina segundo Cacciò *et al.* (2002).

Desnaturação inicial		94°C	5 minutos
35 ciclos	Desnaturação	94°C	30 segundos
	Annealing	60°C	30 segundos
	Extensão	72°C	1 minuto
Extensão final		72°C	7 minutos

Na segunda reacção de amplificação do *nested* PCR foram utilizados os oligonucleótidos G2005F e G2005R (Tabela I) amplificando-se fragmentos de 511 pb. Para a amplificação deste produto usou-se um ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos de amplificação a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, seguidos de um extensão final de 7 minutos a 72°C (Tabela III).

As reacções de PCR foram realizadas no termociclador *Biometra T-Personal* (Alfagene).

Tabela III – Condições das reacções de PCR para amplificação de fragmentos específicos do gene da β -giardina segundo *Lalle et al.* (2005).

Desnaturação inicial		95°C	15 minutos
35 ciclos	Desnaturação	95°C	30 segundos
	<i>Annealing</i>	55°C	30 segundos
	Extensão	72°C	1 minuto
Extensão final		72°C	7 minutos

3.2.1. Visualização dos fragmentos de DNA amplificados

De modo a verificar se houve ou não amplificação dos diversos fragmentos de DNA estudados, 5 μ L dos produtos de PCR foram misturados com 2 μ L de uma solução aquosa de azul de bromofenol e foram aplicados nos poços de um gel de agarose (*Bioplastics RESultTM LE*) a 1,2% (TBE, p/v) com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) (*plus one, Pharmacia Biotech*). Para comprovação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado um padrão de DNA apropriado (100 bp *Ladder, Bioron*) em cada reacção de electroforese.

As migrações electroforéticas decorram a 80 V durante 90 minutos, em tampão de corrida TBE 1x. O gel foi visualizado e fotografado (*Uvitec-Uvisave, Alfagene*) sobre luz ultravioleta, num transiluminador adequado (*Vilbert Lourmat*).

3.3. Restrição enzimática dos produtos de PCR (PCR-RFLP)

A técnica de PCR-RFLP é utilizada na genotipagem de diversos microrganismos e envolve a amplificação de uma sequência conhecida de um determinado gene, corte com enzimas de restrição e a análise dos fragmentos restringidos. As enzimas de restrição, designadas de endonucleases, são enzimas bacterianas que reconhecem sequências nucleótídicas específicas do DNA de cadeia dupla e cortam o DNA nesses locais. Estas enzimas cortam o DNA em fragmentos de vários comprimentos, dependendo da posição e do número de vezes que o local de reconhecimento da respectiva enzima se repete ao longo da cadeia. O PCR-RFLP tem sido um método de genotipagem muito utilizado na caracterização de isolados de *G. lamblia*, tanto provenientes de culturas axénicas como de quistos.

No presente trabalho, a caracterização genética de *G. lamblia* foi realizada por amplificação e restrição de fragmentos do gene da β -giardina segundo a metodologia descrita por Lalle *et al.* (2005).

Para tal, os produtos do *nested* PCR (511 pb) foram submetidos à restrição enzimática a 37°C durante 4 horas na presença de 10 U de *HaeIII* (*Invitrogen*) e de tampão de digestão (tampão H^{1x}) para um volume final de 20 μ L. Deste modo, adicionou-se em banho de gelo 7,5 μ L de água ultrapura esterilizada, 2,5 μ L de tampão H^{10x}, 10 μ L de produto amplificado e 2 μ L de enzima (5 U/ μ L).

O local de corte da enzima é o seguinte:

$$5' - GG\downarrow CC - 3'$$
$$3' - CC\uparrow GG - 5'$$

3.3.1. Visualização dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP

Para visualizar os fragmentos de DNA restringidos pela enzima *HaeIII*, 10 μ L dos produtos de restrição foram misturados com 2 μ L de solução aquosa de azul de bromofenol e foram aplicados nos poços de um gel de agarose (*Bioplastics*

RESult™ LE) a 3% (TBE, p/v) com 2 µL de brometo de etídio a 1 mg/mL (*plus one*, *Pharmacia Biotech*). Para estimar o tamanho dos fragmentos digeridos utilizou-se um marcador de massa molecular apropriado (50 bp DNA *Ladder*, *Fermentas*). A migração electroforética decorreu a 80 V durante cerca de 90 minutos em tampão de corrida TBE 1x. O gel foi visualizado e fotografado (*Uvitec-Uvisave*, *Alfagene*) sobre luz ultravioleta, num transiluminador adequado (*Vilbert Lourmat*).

3.4. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação, antes de serem sujeitos à sequenciação, foram purificados através da utilização do kit *QIAquick® PCR Purification Kit* (*QIAGEN*), segundo as instruções do fabricante. As purificações foram feitas a partir de 20 µL de produto de amplificação, ficando o produto purificado eluído em 50 µL de tampão. Os produtos de amplificação purificados foram conservados a uma temperatura de -20°C até serem sequenciados.

3.5. Sequenciação e análise dos fragmentos de DNA amplificados

As sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA amplificados e purificados foram determinadas em ambos os sentidos pelo método dos terminadores de cadeia (Sanger *et al.*, 1977) automatizado, utilizando o kit *ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*) e o sequenciador automático *ABI Prism 310* (*Applied Biosystems*).

O fundamento do método baseia-se na adição de marcadores fluorescentes às extensões dos fragmentos de DNA durante a reacção de sequenciação. Os marcadores são incorporados através de di-desoxinucleótidos terminadores marcados na região 3'. Os tubos de reacção são colocados individualmente no aparelho e estabelece-se o contacto entre o cátodo e o ânodo através de um tubo capilar preenchido com um polímero. A amostra atravessa o tubo capilar graças à

corrente eléctrica estabelecida durante a electroforese. Quando os fragmentos de DNA marcados atingem a zona de detecção, um laser excita os marcadores fluorescentes. A fluorescência emitida é lida pelo aparelho enquanto um *software* apropriado decifra o resultado, ordenando as bases, em função do tempo de detecção e das características do sinal.

As sequências nucleotídicas obtidas foram individualmente analisadas através das plataformas informáticas *Chromas Lite 2.01* (*Technelysium Pty Ltd*), *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997), *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) e *MEGA 4.0* (Tamura *et al.*, 2007).

4. Tratamento estatístico dos dados

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa informático SPSS 15.0 para o Microsoft Windows.

Para comparação dos métodos de diagnóstico foi utilizado o valor estatístico de kappa (k). Valores de k acima de 0,75 representam uma excelente concordância, enquanto que valores abaixo de 0,40 são indicativos de uma fraca concordância (Altman, 1991). O valor de p indica quando os valores de k diferem significativamente de zero (ou seja, sem concordância).

A avaliação da associação entre a carga parasitária e os diferentes grupos genéticos foi obtida recorrendo ao método de qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

O trabalho desenvolvido teve como principal objectivo a caracterização genética de *G. lamblia* de forma a identificar os assemblages/genótipos que circulam no nosso país e determinar o potencial papel dos animais na transmissão da parasitose. Para isso, procedeu-se ao estudo parasitológico de fezes de origem humana e canina, através da detecção de antígenos de *G. lamblia* e do exame microscópico após concentração das fezes. Posteriormente, as amostras positivas a *G. lamblia* foram processadas com vista à caracterização genotípica por amplificação, restrição e sequenciação de fragmentos específicos do gene da β -giardina. Foi também realizada a análise filogenética de forma a avaliar a homologia entre os isolados de Portugal bem como com alguns já descritos noutros países.

1. Estudo coproparasitológico

O estudo parasitológico foi realizado em crianças com idades compreendidas entre os 4 meses e os 3 anos, que frequentavam uma creche da região Norte do país e em cães com idades compreendidas entre os 3 meses e os 4 anos, provenientes de um canil municipal da mesma região. O estudo englobou 90 amostras fecais de origem humana e animal que foram submetidas a um teste imunocromatográfico para detecção de antígenos de *G. lamblia* (*Simple Giardia*, *Operon*, s.a.) e ao exame microscópico após concentração das fezes (*Copropack* S.A.F., *Biomedics*, S.L.).

1.1. Detecção de antígenos de *G. lamblia* – teste imunocromatográfico

Das 90 amostras fecais (61 de origem canina e 29 de origem humana) submetidas ao teste imunocromatográfico, 34 (37,8%) foram positivas enquanto que 56 (62,2%) foram negativas ao teste (Tabela IV). No grupo das amostras de origem humana, 4 (13,8%) foram positivas e 25 (86,2%) foram negativas. Relativamente às amostras de origem canina, 30 (49,2%) foram positivas, enquanto 31 (50,8%) foram negativas (Figura 6).

Tabela IV – Pesquisa de antígenos de *G. lamblia* nas fezes humanas e caninas pelo teste imunocromatográfico (*Simple Giardia*, *Operon*, s.a.).

	Negativo	Positivo	Totais
Humanas	25 (86,2%)	4 (13,8%)	29
Caninas	31 (50,8%)	30 (49,2%)	61
Totais	56 (62,2%)	34 (37,8%)	90

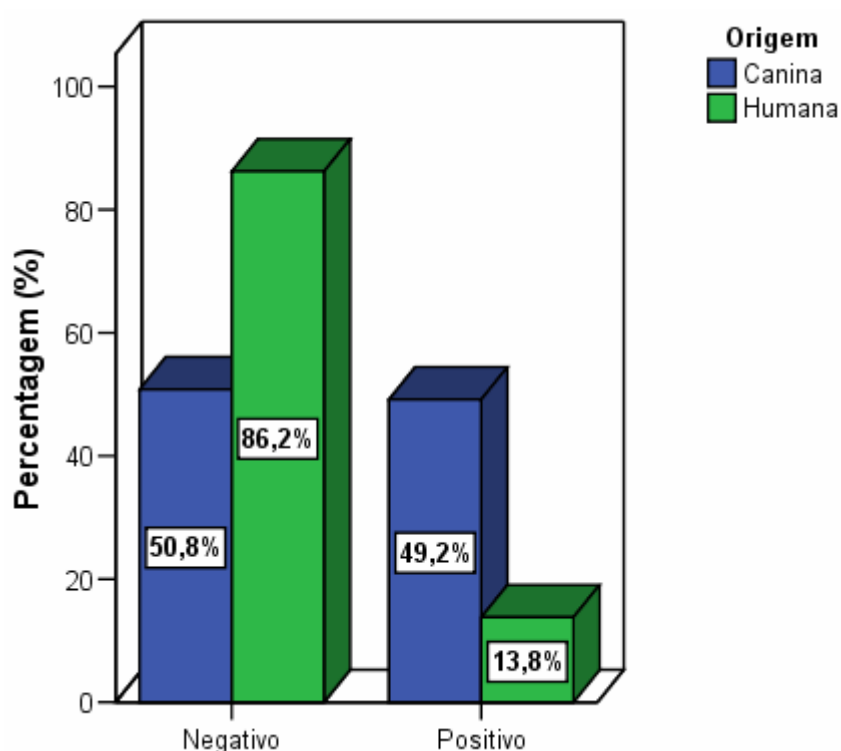


Figura 6 – Detecção de antígenos de *G. lamblia* nas fezes pelo método imunocromatográfico (*Simple Giardia*, *Operon*, s.a.) em função da origem da amostra, humana e canina.

1.2. Exame microscópico após concentração

As amostras fecais submetidas ao exame imunocromatográfico para detecção de antígenos de *G. lamblia* foram também submetidas a um exame microscópico após concentração (*Copropack S.A.F.*, *Biomedics*, S.L.). Este exame permitiu

observar estruturas parasitárias de protozoários e helmintas e semi-quantificar o número de quistos de *Giardia* por preparação.

Nas 29 amostras fecais humanas observaram-se quistos de *G. lamblia* em 2 amostras (6,9 %) (Figura 7 e Tabela V) e ovos de *Ascaris lumbricoides* em 1 amostra (3,4%). Nas restantes 26 amostras de origem humana (89,7%) não se observaram quaisquer outras estruturas parasitárias. Em nenhuma amostra foi detectada qualquer mistura de parasitas.

Relativamente ao exame microscópico efectuado às 61 amostras de origem canina, a prevalência geral de parasitas foi de 55,7% (34 amostras positivas). 25 das amostras (41%), apresentaram infecções simples, ou seja, com uma só espécie de parasita, e 9 (14,7%) apresentaram infecções múltiplas (Figura 8). Os protozoários foram os parasitas mais prevalentes na população canina e dentro deste grupo, *Giardia* foi o parasita que apresentou prevalências mais elevadas (Figuras 8 e 9). De facto, foram observados quistos de *Giardia* (Figura 9-A) em 30 amostras de fezes caninas (49,2%) (Figura 7).

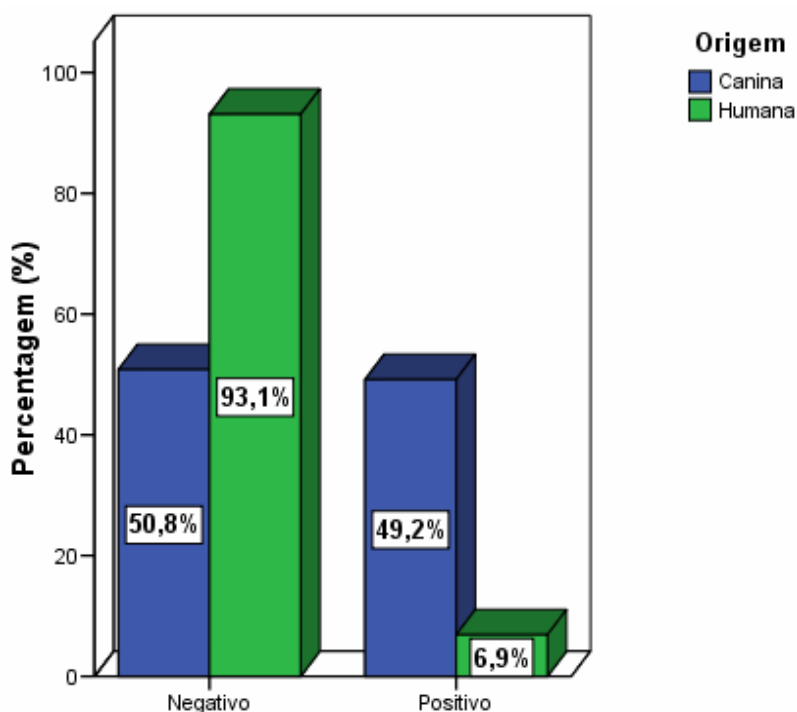


Figura 7 – Detecção de quistos de *Giardia* nas fezes através da observação microscópica após concentração (Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.) em função da origem da amostra, humana e canina.

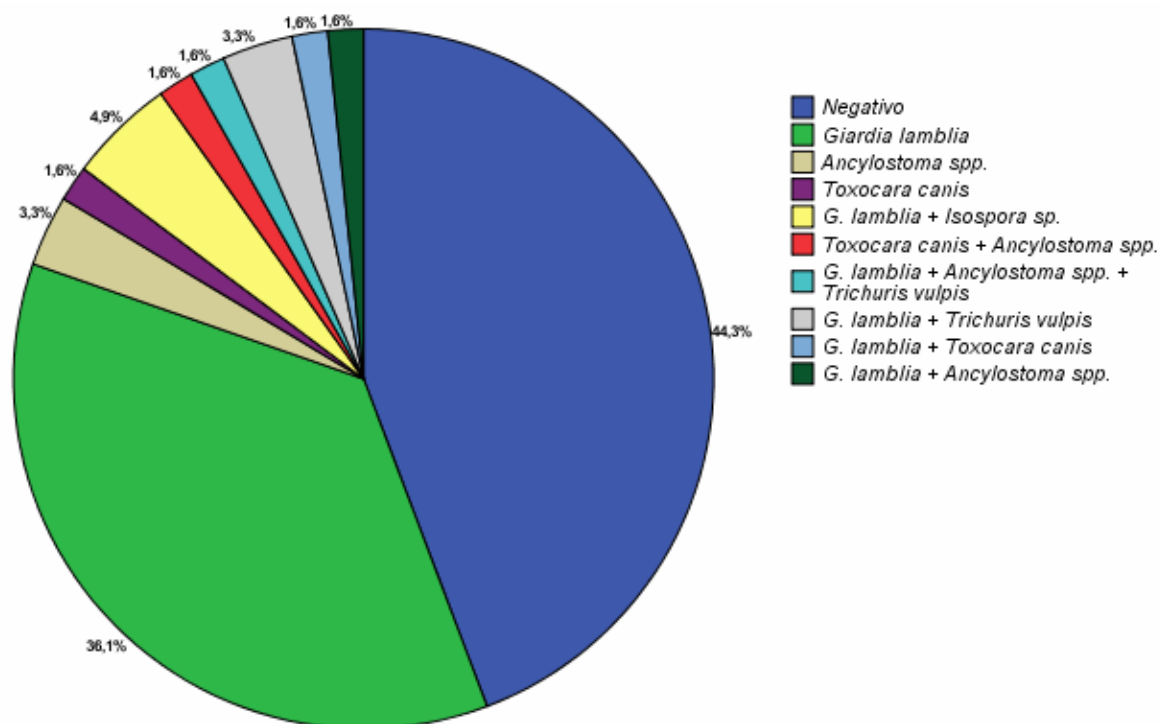


Figura 8 – Distribuição dos parasitas protozoários e helmintas nas amostras de origem canina. A identificação foi realizada através do exame microscópico após concentração das amostras fecais (Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.).

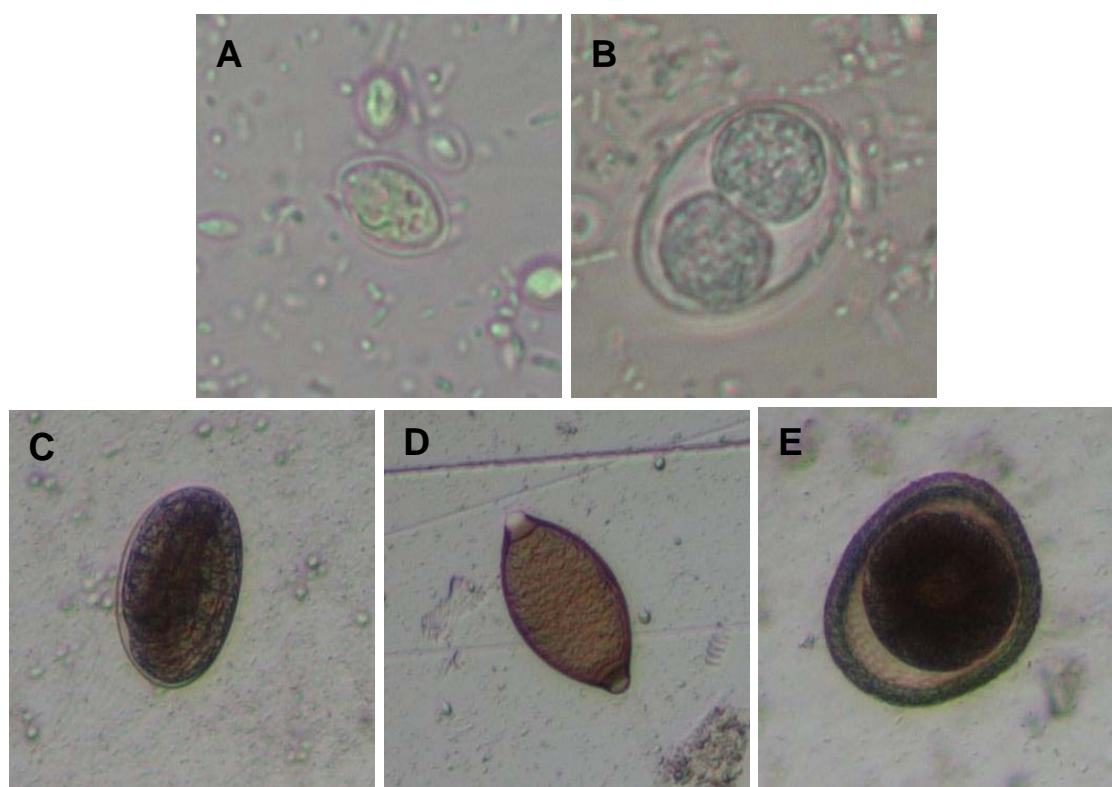


Figura 9 – Fotografias de estruturas parasitárias detectadas nas fezes caninas através do exame microscópico após concentração das amostras (Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.).
A – Quisto de *Giardia*; **B** – Ooquisto de *Isospora* sp. **C** – Ovo de *Ancylostoma* spp.; **D** – Ovo de *Trichuris vulpis*; **E** – Ovo de *Toxocara canis*; (Microscópio Eclipse E400, Nikon, acoplado à câmara digital DN100, Nikon; **A** e **B** ampliação x400; **C**, **D** e **E** ampliação x100)

Adicionalmente, nas 30 amostras caninas onde se observaram quistos de *Giardia*, verificou-se multiparasitismo em 8 amostras (Figura 8). De facto, foram também identificados ooquistos de *Isospora* sp. (Figura 9-B) em 3 amostras (4,9%), ovos de *Ancylostoma* sp. (Figura 9-C) em 1 amostra (1,6%), ovos de *Trichuris vulpis* (figura 9-D) em 2 amostras (3,3%), ovos de *Toxocara canis* (Figura 9-E) em 1 amostra (1,6%) e ovos de *Ancylostoma* sp. e *Trichuris vulpis* em 1 amostra (1,6%) (Figura 8). Em 4 amostras de origem canina, positivas a parasitas mas negativas a *Giardia*, identificaram-se ovos de *Ancylostoma* sp. (Figura 9-C) em 2 amostras (3,3%) (Figura 8), ovos de *Toxocara canis* (Figura 9-E) em 1 amostra (1,6%) e ovos de *Ancylostoma* sp. e de *Toxocara canis* numa outra amostra (1,6%) (Figura 8).

Como foi referido inicialmente, o exame microscópico permitiu além da identificação de estruturas parasitárias, uma semi-quantificação dos quistos de *Giardia* presentes em cada preparação. Em relação às 2 amostras de origem humanas observaram-se 1 a 5 quistos por preparação (classificadas como +) (Tabela V). Das 30 amostras caninas positivas a *Giardia*, foram observados 1 a 5 quistos por preparação (classificadas como +) em 16 amostras (26,2%), 5 a 10 quistos por preparação (classificadas como ++) em 4 amostras (6,6%), 10 a 20 quistos por preparação (classificadas como +++) em 5 amostras (8,2%) e mais de 20 quistos por preparação (classificadas como +++) em igualmente 5 amostras (8,2%) (Tabela V).

Tabela V – Distribuição das amostras em função da quantidade de quistos de *G. lamblia* observados por preparação através do exame microscópico após concentração da amostra (Copropack S.A.F., Biomedics, S.L.). (+: 1 a 5 quistos por preparação; ++: 5 a 10 quistos por preparação; +++: 10 a 20 quistos por preparação; +++++: > 20 quistos por preparação).

	Negativas	Positivas			
		+	++	+++	++++
Humanas (n=29)	27 (93,1%)	2 (6,9%)	-	-	-
Caninas (n=61)	31 (50,8%)	16 (26,2%)	4 (6,6%)	5 (8,2%)	5 (8,2%)

1.3. Comparação dos dois métodos utilizados na detecção de *Giardia*

A prevalência de *G. lamblia* obtida pelos dois métodos utilizados para a detecção do parasita está representada na tabela VI. A prevalência obtida pelo método imunocromatográfico nas amostras humanas foi de 13,8% (4 amostras em 29), enquanto que através do exame microscópico foi de 6,9% (2 amostras em 29). Relativamente às amostras de origem canina, a prevalência foi de 49,2% nos dois métodos utilizados (30 amostras em 61). Contudo, esta igualdade de valores não corresponde a uma concordância absoluta. De facto, existem oito amostras caninas cujos resultados pelos dois métodos não são sobreponíveis mas que se anulam. Ou seja, 4 amostras (6,6%) foram classificadas positivas pelo exame imunocromatográfico mas negativas pelo exame microscópico, enquanto que outras 4 foram classificadas negativas pelo exame imunocromatográfico mas positivas pelo exame microscópico (Tabela VI).

No entanto, a comparação dos dois métodos revelou uma excelente concordância estatística ($k=0,761$; $p<0,001$).

Tabela VI – Comparação dos métodos imunocromatográfico e exame microscópico após concentração na detecção de *G. lamblia* em função da origem das amostras, humanas e caninas. ($k=0,761$; $p<0,001$)

Imunocromatografia / Microscopia	Humanas (n=29)	Caninas (n=61)
+ / +	2 (6,9%)	26 (42,6%)
+ / -	2 (6,9%)	4 (6,6%)
- / +	0	4 (6,6%)
- / -	25 (86,2%)	27 (44,2%)

2. Estudo molecular

As amostras de fezes consideradas infectadas com *Giardia*, ou seja, as amostras com resultados positivos no exame imunocromatográfico e/ou no exame microscópico (34 de origem animal e 4 de origem humana) foram submetidas à extracção de DNA genómico (*QIAamp® DNA Stool Mini Kit*, Qiagen) para serem caracterizadas através de técnicas de biologia molecular. Em conjunto com estas amostras, foram também incluídas 30 amostras de DNA genómico extraído de fezes humanas positivas a *Giardia* e de culturas de trofozoítos axenizados, provenientes de estudos anteriormente realizados. Assim, foram estudadas molecularmente 68 amostras, 34 de origem humana e 34 de origem canina.

2.1. Amplificação de DNA por PCR

As amostras foram submetidas a duas técnicas de PCR diferentes que amplificaram dois fragmentos do gene da β -giardina. O *nested* PCR descrito por Lalle *et al.* (2005) amplificou fragmentos de 511 pb (Figura 10), que foram utilizados para a genotipagem por restrição enzimática (PCR-RFLP). O *semi-nested* PCR descrito por Cacciò *et al.* (2002) originou fragmentos de 383 pb (Figura 11), que foram utilizados para a genotipagem por sequenciação e análise filogenética.

Os resultados apresentados nas figuras 10 e 11 representam fragmentos exemplificativos de algumas amostras estudadas.

Obteve-se amplificação em 94,1% das amostras pelo *nested* PCR e 95,4% pelo *semi-nested* PCR. Em 4 amostras caninas (5,9%) não foi possível a amplificação dos fragmentos de DNA específicos da β -giardina pelo *nested* PCR e em 3 amostras caninas (4,4%) não foi possível a amplificação dos fragmentos de DNA específicos da β -giardina pelo *semi-nested* PCR. Em oito amostras, o fragmento 511 pb, utilizado para o PCR-RFLP, foi também sujeito à sequenciação.

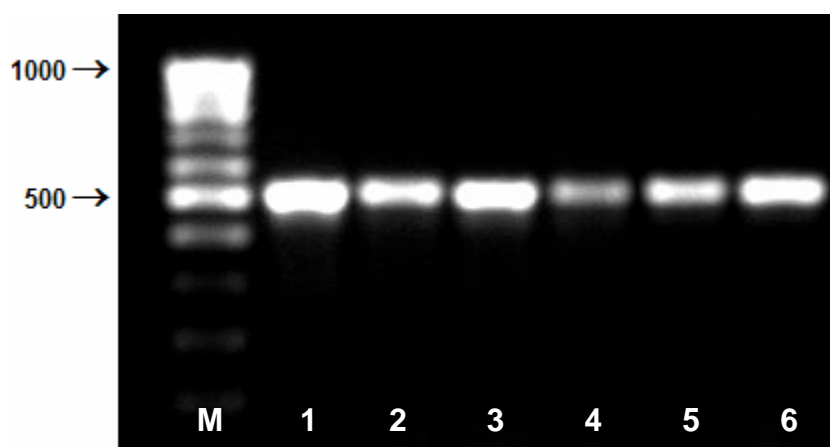


Figura 10 – Separação electroforética em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos produtos do *nested* PCR do gene da β -giardina. Os fragmentos de 511 pb foram amplificados pelos oligonucleótidos G7, G759, G2007R e G2007F. **M** – Marcador de massa molecular de 100 pb DNA LadderTM; **1 a 6** – Amostras estudadas.

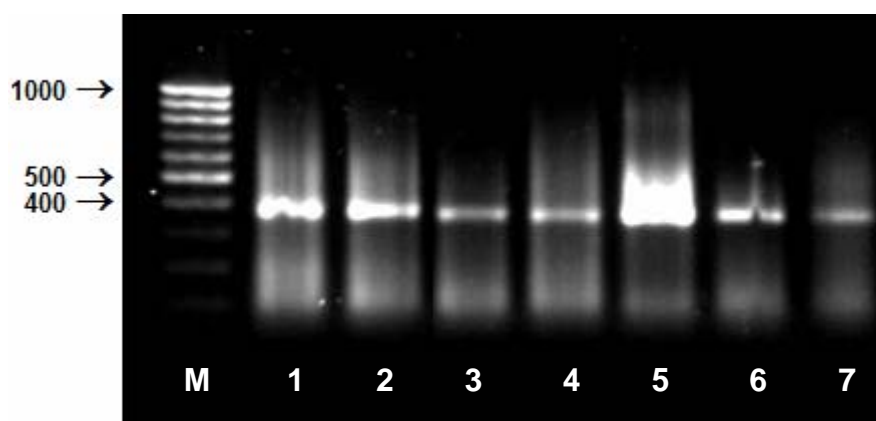


Figura 11 – Separação electroforética em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos produtos do *semi-nested* PCR do gene da β -giardina. Os fragmentos de 383 pb foram amplificado pelos oligonucleótidos G7, G376 e G759. **M** – Marcador de massa molecular de 100 pb DNA LadderTM; **1 a 7** – Amostras estudadas.

2.2. Identificação genotípica pela técnica de PCR-RFLP

Das 68 amostras de origem humana e canina sujeitas à amplificação do fragmento específico do gene da β -giardina (511 pb) por *nested* PCR, observou-se a amplificação em 64 amostras que foram posteriormente submetidas à restrição enzimática (RFLP). A enzima de restrição *Hae*III utilizada reconhece

diversos locais de corte específicos dos assemblages A, B, C, D, E e F de *G. lamblia* produzindo fragmentos de tamanhos diferentes (Tabela VII).

Tabela VII – Diferenciação dos assemblages A, B, C, D, E e F por restrição enzimática do fragmento de 511 pb do gene da β -giardina como descrito previamente (Lalle *et al.*, 2005).

Assemblage	Enzima	Fragmentos esperados (pb)
A	<i>HaeIII</i>	201 + 150 + 110 + 50
B	<i>HaeIII</i>	150 + 117 + 110 + 84 + 26
C	<i>HaeIII</i>	194 + 150 + 102 + 50 + 15
D	<i>HaeIII</i>	200 + 194 + 117
E	<i>HaeIII</i>	186 + 150 + 110 + 26 + 24 + 15
F	<i>HaeIII</i>	186 + 150 + 110 + 50 + 15

Na figura 12 podem-se observar perfis electroforéticos representativos de algumas amostras estudadas. O perfil típico das amostras correspondentes a isolados do assemblage A foi facilmente identificado uma vez que as 4 bandas (201, 150, 110 e 50 pb) esperadas após a restrição são perfeitamente distinguíveis. O perfil característico do assemblage C é semelhante ao perfil do assemblage A, sendo fundamentalmente diferenciado através da presença da banda de 102 pb, que tem uma migração ligeiramente mais rápida que a banda de 110 pb presente no assemblage A. O perfil característico do assemblage D é também fácil de identificar, porque é o único que apresenta apenas duas bandas visíveis (200 e 117 pb), devido à proximidade dos fragmentos de 200 e 194 pb que são visualizados como uma só neste gel. As amostras co-infectadas são mais difíceis de identificar devido à proximidade dos fragmentos comuns a vários assemblages. Contudo, no presente trabalho foi possível identificar uma mistura de assemblages A e C (Figura 12) numa amostra canina. De facto, observaram-se 5 bandas (201, 150, 110 e 50 pb) características do assemblage A e uma outra banda ténue (102 pb), característica do assemblage C, adjacente à banda de 110 pb. Nas amostras potencialmente co-infectadas com isolados dos assemblages A

e D a interpretação tornou-se mais difícil devido à proximidade dos tamanhos dos fragmentos obtidos após digestão (Figura 12). As bandas de 200 pb (assemblage A), 201 e 194 pb (assemblage D) poderão aparecer como uma banda, bem como as bandas de 117 pb (assemblage A) e de 110 pb (assemblage D). Assim, as amostras com assemblage A e D poderão produzir apenas duas bandas intensas de aproximadamente 200 e 117 pb e uma terceira banda de 150 pb que é característica do assemblage A e que não aparece no assemblage D. Estes resultados foram obtidos em três amostras de origem canina.

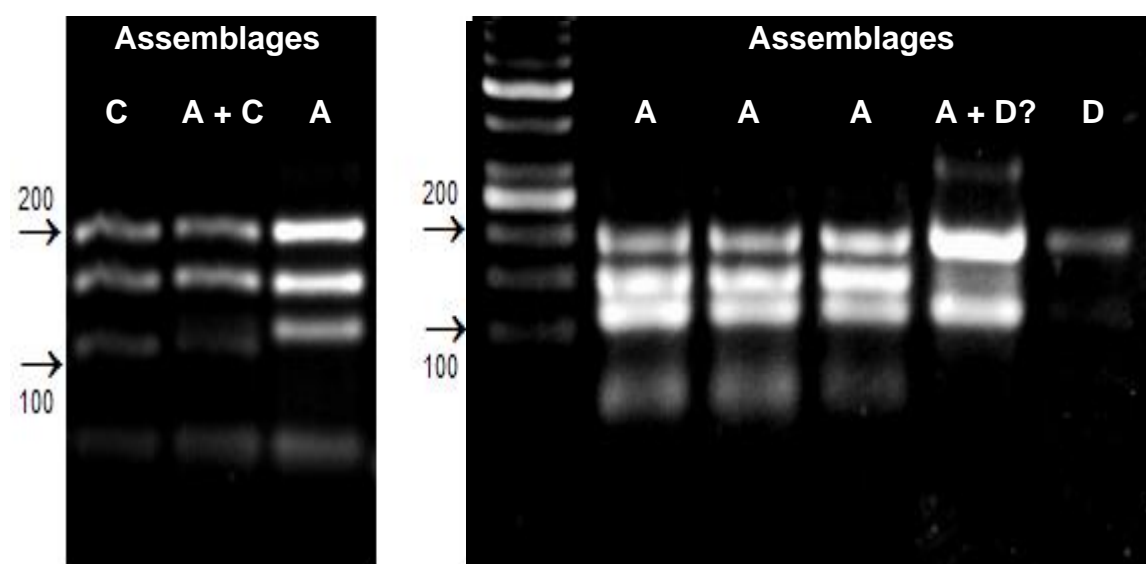


Figura 12 – Diferenciação dos assemblages A, C e D por PCR-RFLP. Separação electroforética em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos produtos obtidos após restrição enzimática com a enzima *HaeIII*. A amplificação de fragmentos de 511 pb do gene da β -giardina foi realizada com os oligonucleótidos G7, G759, G2007R e G2007F. (Marcador de massa molecular de 100 pb DNA Ladder™)

Em relação aos resultados obtidos por PCR-RFLP (Tabela VIII), detectaram-se 54 amostras pertencentes ao assemblage A (22 de origem canina e 32 de origem humana), 2 amostras pertencentes ao assemblage B (origem humana), 2 amostras pertencente ao assemblage C (origem canina), 2 amostras pertencentes ao assemblage D (origem canina), 1 amostra coinfectada com assemblage A e C

(origem canina) e 3 amostras potencialmente coinfectadas com assemblage A e D (origem canina).

Tabela VIII – Distribuição dos assemblages de *G. lamblia* em função da origem das amostras, humanas e caninas. A identificação dos assemblages foi realizada pela técnica de PCR-RFLP através do fragmento de 511 pb do gene da β -giardina segundo Lalle *et al.* (2005).

Assemblage	Humanas	Caninas	Total
A	32 (94,1%)	22 (73,3%)	54
B	2 (5,9%)	0	2
C	0	2 (6,7%)	2
D	0	2 (6,7%)	2
A + C	0	1 (3,3%)	1
A + D	0	3 (10,0%)	3
Total	34	30	64

2.3. Identificação genotípica por sequenciação

A sequenciação dos produtos amplificados do gene da β -giardina foi realizada com sucesso em 65 amostras. Em 57 amostras a sequenciação foi realizada a partir de um fragmento de 383 pb do gene da β -giardina, produto do *semi-nested* PCR descrito por Cacciò *et al.* (2002). As restantes 8 amostras foram sequenciadas a partir de um outro fragmento específico do gene da β -giardina de 511 pb, produto de um *nested* PCR descrito por Lalle *et al.* (2005). Estes dois fragmentos partilham uma região comum de 233 pb, rica em polimorfismos que permitem identificar os diferentes assemblages.

A análise das sequências foi realizada numa primeira abordagem através das plataformas informáticas e posteriormente através da análise individual dos cromatogramas obtidos na sequenciação. A análise das zonas polimórficas do gene da β -giardina permitiu distinguir os assemblages de *G. lamblia* presentes em cada uma das amostras. A figura 13 representa cromatogramas parciais de

fragmentos do gene da β -giardina que diferenciam os assemblages A, B, C e D. Na figura 13-a pode-se verificar a existência de um pico correspondente a uma guanina (G) no nucleótido (nt) 393 assim como um de timina (T) no nt 396. Sabendo-se que a guanina no nt 393 é característica dos assemblages A, C, E e F e que a timina no nt 396 é apenas característica dos assemblages A e D, conclui-se que esta sequência corresponde exclusivamente a um isolado pertencente ao assemblage A de *G. lamblia*.

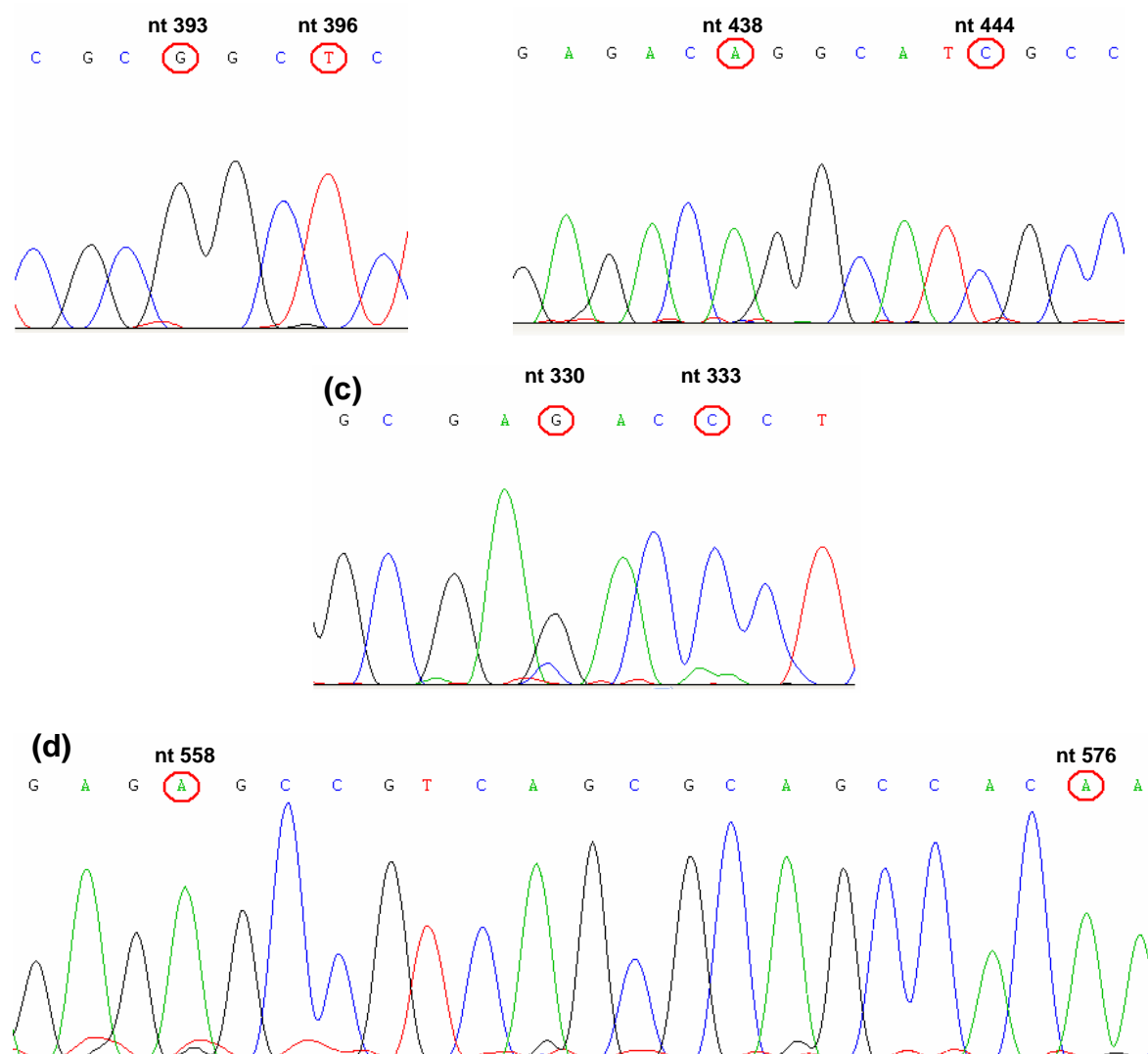


Figura 13 – Diferenciação dos assemblages A, B, C e D através de cromatogramas exemplificativos obtidos após sequenciação de fragmentos do gene da β -giardina. **(a)** Detalhe de um perfil característico do assemblage A (G no nt 393 e T no nt 396); **(b)** Detalhe de um perfil característico do assemblage B (A no nt 438 e C no nt 444); **(c)** Detalhe de um perfil característico do assemblage C (G no nt 330 e C no nt 333); **(d)** Detalhe de um perfil característico do assemblage D (A no nt 558 e A no nt 576). A numeração dos nucleótidos foi feita em relação à distância do codão de iniciação ATG da estirpe de referência Portland-1 (número de acesso X14185 no *GenBank*).

A figura 13-b representa a sequência de um fragmento do gene da β -giardina característica do assemblage B. A presença de uma adenina (A) no nt 438 identifica o assemblage B, único com esta base nesta posição. A citosina (C) no nt 444 exclui o assemblage A, único assemblage que apresenta uma timina nessa posição.

A figura 13-c representa a sequência de um fragmento do gene da β -giardina característica do assemblage C. A guanina no nt 330 é característica dos assemblages C e D enquanto que a citosina no nt 333 é específica do assemblage C.

A figura 13-d representa o assemblage D. As duas adeninas nos nt 558 e nt 576 são específicas de sequências pertencentes ao assemblage D.

A identificação dos genótipos de *G. lamblia* (A1, A2, A3, B2, B3 e B4) pertencentes aos assemblages A e B, bem como a identificação das misturas de assemblages/genótipos foi realizada da mesma forma tendo em conta os polimorfismos característicos (Anexo II).

A análise das sequências do gene da β -giardina permitiu identificar os assemblages/genótipos de 65 amostras infectadas com *G. lamblia* (Tabela IX). Assim, nas amostras de origem humana foram identificados o genótipo A1 em 22 amostras (64,7%), o genótipo A2 em 2 amostras (5,9%), o genótipo A3 em 4 amostras (11,8%), os genótipos A1 e A2 em 2 amostras (5,9%), os genótipos A2 e A3 em 1 amostra (2,9%), os genótipos A1 e A2 ou A3 em 1 amostra (2,9%) e os genótipos B4 e B2 ou B3 em 2 amostras (5,9%).

Nas amostras de origem canina, foram identificados o genótipo A1 em 20 amostras (64,5%), os genótipos A1 e A2 em 1 amostra (3,2%), o assemblage C em 2 amostras (6,5%), o assemblage D em 2 amostras (6,5%), o assemblage C e o genótipo A1 em 2 amostras (6,5%) e o assemblage D e o genótipo A1 em 4 amostras (12,9%).

Em relação à presença de misturas de assemblages/genótipos nas amostras de origem humana, pode verificar-se que foram identificadas em 6 amostras (17,6%) misturas de genótipos pertencentes ao mesmo assemblage (A1, A2 e A3) (Tabela IX). Contrariamente, as misturas de assemblages/genótipos identificadas em 7 amostras (22,6%) de origem canina foram na maioria de diferentes

assemblages, só uma amostra é que apresentou uma mistura de dois genótipos do mesmo assemblage (A1 e A2) (Tabela IX).

Tabela IX – Distribuição dos assemblages e genótipos de *G. lamblia* em função da origem das amostras, humanas e caninas. A genotipagem foi realizada por sequenciação de fragmentos do gene da β -giardina.

Assemblage/genótipo	Humanas	Caninas	Total
A1	22 (64,7%)	20 (64,5%)	42
A2	2 (5,9%)	0	2
A3	4 (11,8%)	0	4
A1 + A2	2 (5,9%)	1 (3,2%)	3
A2 + A3	1 (2,9%)	0	1
A1 + A2 ou A3	1 (2,9%)	0	1
B4 + B2 ou B3	2 (5,9%)	0	2
C	0	2 (6,5%)	2
D	0	2 (6,5%)	2
C + A1	0	2 (6,5%)	2
D + A1	0	4 (12,9%)	4
Total	34	31	65

Analisando os resultados obtidos pela sequenciação (Tabela IX) e relativamente à totalidade dos isolados identificados, observa-se que nas amostras de origem humana foram identificados 36 isolados de *G. lamblia* pertencentes ao assemblage A (90%) e 4 isolados do assemblage B (10%) (Figura 14). Em relação às amostras de origem canina, foram identificados 28 isolados de *G. lamblia* pertencentes ao assemblage A (73,7%), 4 isolados ao assemblage C (10,5%) e 6 isolados pertencentes ao assemblage D (15,8%) (Figura 14).

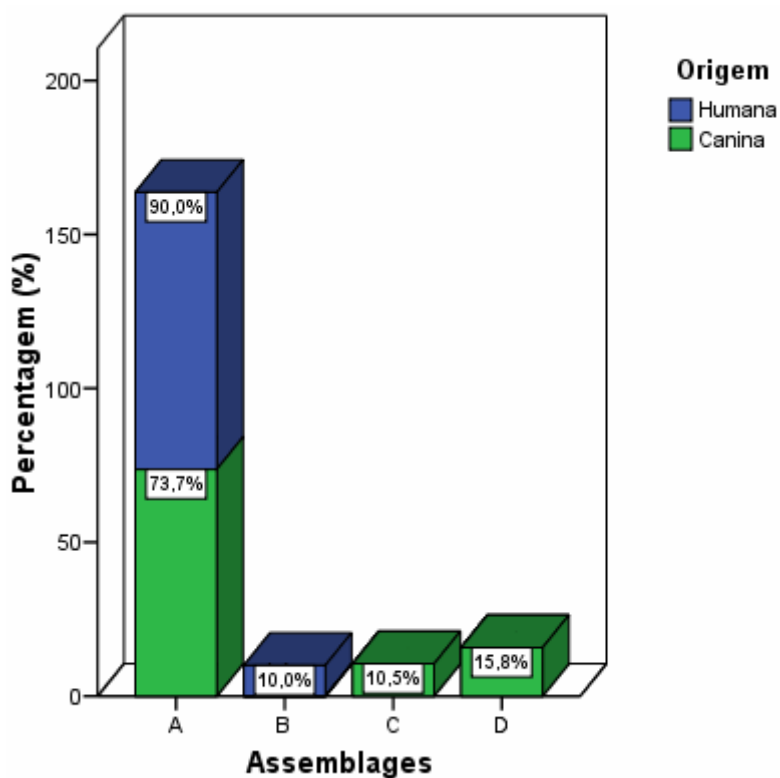


Figura 14 – Distribuição dos assemblages A, B, C e D de *G. lamblia* em função da origem da amostra. Os resultados foram expressos em percentagem do número total de isolados identificados.

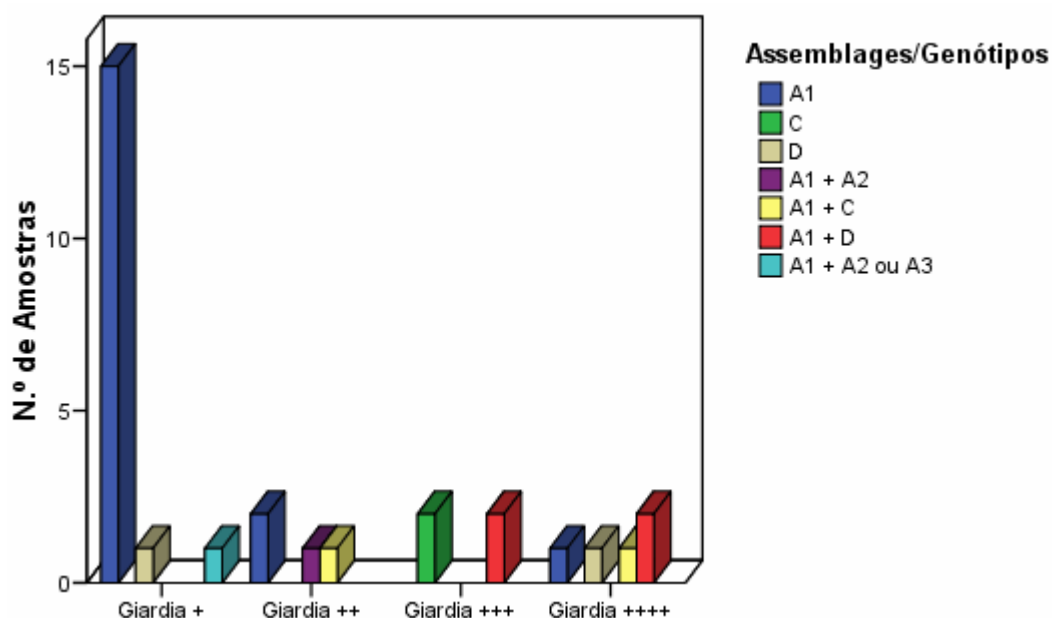


Figura 15 – Relações entre a quantidade de quistos observados através do exame microscópico e os assemblages/genótipos de *G. lamblia* presentes nas amostras ($\chi^2=42,5$; $p=0,001$). (+: 1 a 5 quistos por preparação; ++: 5 a 10 quistos por preparação; +++: 10 a 20 quistos por preparação; ++++: > 20 quistos por preparação).

Alguns estudos têm relacionado a sintomatologia com os diferentes assemblages e genótipos. No presente trabalho, estudaram-se as relações entre a carga parasitária, avaliada em função da excreção de quistos nas fezes, e os diferentes grupos genéticos (Figura 15). Observa-se que o genótipo A1 está fortemente associado a uma baixa excreção de quistos e que as cargas parasitárias elevadas estão associadas às misturas entre o assemblage A e os assemblages específicos do cão (C e D) ($\chi^2=42,5$; $p=0,001$).

2.4. Alinhamento de sequências

O alinhamento das sequências estudadas foi realizado através das plataformas informática *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) e *MEGA 4.0* (Tamura *et al.*, 2007).

Comparando as sequências obtidas no presente estudo, desde o nt 383 até ao nt 609 do gene da β -giardina, com algumas sequências de referência de diferentes assemblages/genótipos (A1, A2, A3, B4, C e D) (Figura 16), podem-se observar as diferenças e as semelhanças encontradas nos isolados de *G. lamblia* caracterizados no presente trabalho, bem como com as que caracterizam cada um dos diferentes grupos genéticos de referência. O alinhamento representado na figura 16 é exemplificativo dos diferentes assemblages/genótipos identificados nas amostras humanas e caninas do presente trabalho. Pode observar-se que 2 isolados humanos (H25 e X4) apresentaram diferenças na sequência em um nucleótido cada, relativamente a todos os outros isolados de *G. lamblia*. De facto, o isolado H25 apresenta uma citosina no nt 421, onde todos os outros isolados apresentam uma timina, e o isolado X4 apresenta uma guanina no nt 436, onde todos os outros apresentam uma adenina. De salientar a semelhança entre as sequências dos mesmos assemblages/genótipos provenientes de diferentes hospedeiros (homem e cão).

		nt 421 nt 436 ↓ ↓	
[Portland1]GenotipoA1	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[X2-Humano]GenotipoA1	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[H25-Humano]GenotipoA1	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[N1-Canino]GenotipoA1	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[AY072723]GenotipoA2	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[X5-Humano]GenotipoA2	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[AY072724]GenotipoA3	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[X4-Humano]GenotipoA3	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[X7-Humano]GenotipoA3	ACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[AY072726]GenotipoB4	ACGCCATCGCAGCCCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTATGACCA	100	
[X1-Humano]GenotipoB4	ACGCCATCGCAGCCCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTATGACCA	100	
[AY545646]AssemblageC	ACGCCATCGCGGCCCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[N15-Canino]AssemblageC	ACGCCATCGCGGCCCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[AY545647]AssemblageD	ACGCCATCGCAGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCTACGGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
[N17-Canino]AssemblageD	ACGCCATCGCAGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCTACGGAGAACGCCGAGAGGAAGAAGATGTACGACCA	100	
	***** ** *****		
[Portland1]GenotipoA1	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[X2-Humano]GenotipoA1	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[H25-Humano]GenotipoA1	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[N1-Canino]GenotipoA1	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[AY072723]GenotipoA2	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGTGTGTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[X5-Humano]GenotipoA2	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGTGTGTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[AY072724]GenotipoA3	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGTGTGTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[X4-Humano]GenotipoA3	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGTGTGTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[X7-Humano]GenotipoA3	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGTGTGTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[AY072726]GenotipoB4	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCTGCCATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTCAGCGCCGCCACGACAGAGGCCCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[X1-Humano]GenotipoB4	GCTCAACGAGAAAGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCTGCCATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTCAGCGCCGCCACGACAGAGGCCCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[AY545646]AssemblageC	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGATTCCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTCAGCGCAGCCACGACCGAGGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[N15-Canino]AssemblageC	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGATTCCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTCAGCGCAGCCACGACCGAGGCGCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[AY545647]AssemblageD	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGATTCCGCCGTAATTTCCGCTGCCATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGCCGTCAGCGCAGCCACAACAGAGGCTCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
[N17-Canino]AssemblageD	GCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGATTCCGCCGTAATTTCCGCTGCCATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGCCGTCAGCGCAGCCACAACAGAGGCTCTCACAACACGAAGCTCGTCGAG	227	
	***** *****		

Figura 16 – Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene da β -giardina de *G. lamblia* (desde o nt 383 até ao 609). As sequências [Portland1], [AY072723], [AY072724], [AY072726], [AY545646] e [AY545647] foram obtidas do *GenBank* e usadas como referência para as amostras apresentadas [X2], [H25] [N1], [X5], [X4], [X7], [X1], [N15], e [N17]. A numeração dos nucleótidos foi feita em relação à distância do codão de iniciação ATG da estirpe de referência Portland-1, número de acesso X14185 no *GenBank*. Os asteriscos indicam as posições onde os nucleótidos são iguais.

2.5. Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada segundo o método de *Neighbour-Joining*, através da utilização da plataforma informática *MEGA* 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), a partir das sequências nucleotídicas do gene da β -giardina de isolados humanos e caninos e de sequências de referência retiradas do *GenBank*. Deste modo, foi possível construir uma árvore filogenética (Figura 17) que permitiu estudar as relações de proximidade de cada um dos diferentes isolados de *G. lamblia*.

A árvore filogenética ficou dividida em oito *clusters*. O primeiro, e mais numeroso, contém o genótipo A1 humano de referência (Portland-1) juntamente com 24 isolados de origem humana e 26 de origem canina. O segundo *cluster* engloba o genótipo A2 humano de referência (AY072723), 5 isolados de origem humana e um de origem canina. O terceiro *cluster* é formado pelo genótipo A3 humano de referência (AY072724) e 5 isolados de origem humana. Muito próximos destes três *clusters* aparecem dois *clusters* formados pelos assemblages F (AY647264) e E (EU189373) específicos de gatos e animais de casco respectivamente. Os restantes *clusters* ficaram mais afastados tendo sido colocado o assemblage C canino de referência (AY545646) num sexto *cluster* juntamente com 4 isolados de origem canina. No sétimo *cluster* foram agrupados o genótipo B4 humano de referência (AY072726) com 2 isolados de origem humana e no último *cluster* aparece o assemblage D canino de referência (AY545647) e 6 isolados de origem canina.

Através da observação dos valores de *bootstrap* (Figura 17), verifica-se que os grupos mais consistentes são o assemblage A (100), o assemblage B4 (99), o assemblage C (94) e o assemblage D (100).

Os isolados humanos H25 e X4 foram colocados no primeiro e terceiro *clusters*, respectivamente A1 e A3, mas apresentam diferenças em relação aos outros isolados dos respectivos *clusters*.

Figura 17 – Análise filogenética de *G. lamblia* pelo método de *neighbour-joining* de sequências do gene da β -giardina (desde o nt 383 até ao nt 609), obtida pelo programa *MEGA* versão 4.0. As amostras analisadas foram comparadas com as sequências de referência: genótipo A1 [Portland1]; genótipo A2 [AY072723]; genótipo A3 [AY072724]; genótipo B4 [AY072726]; assemblage C [AY545647]; assemblage D [AY545646]; assemblage E [EU189373] e assemblage F [AY647264] obtidas do *GenBank*.

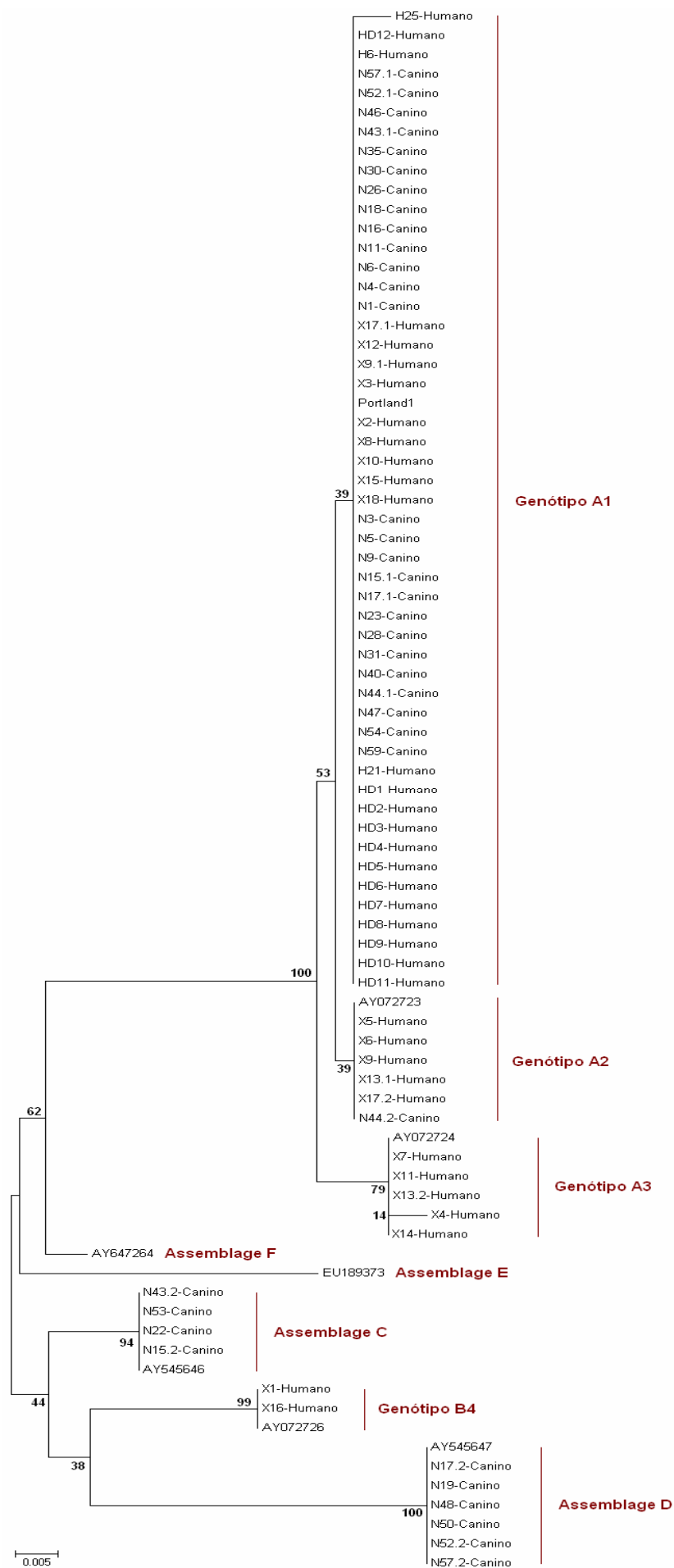


Figura 17 – (legenda na página anterior)

DISCUSSÃO

G. lamblia apresenta uma dispersão global, sendo o parasita intestinal mais comum em humanos nos países desenvolvidos. Além disso, tem sido também encontrado em animais domésticos, nomeadamente em animais de casco, cães e gatos e ainda em alguns animais selvagens e aves. Durante os últimos anos, têm sido feitos inúmeros esforços para se tentar saber se alguns desses animais podem actuar como reservatórios, transmissores ou receptores de *G. lamblia*.

O trabalho desenvolvido teve como principal objectivo a caracterização genética de *G. lamblia* de forma a identificar os assemblages/genótipos que circulam no nosso país e determinar o potencial papel dos cães na transmissão da parasitose. Para isso, procedeu-se inicialmente ao estudo parasitológico de fezes de origem humana e canina e, de seguida, as amostras positivas a *G. lamblia* foram caracterizadas genotipicamente e avaliadas as suas relações filogenéticas.

O exame coproparasitológico foi realizado por observação microscópica após concentração das fezes e pela pesquisa de antígenos de *Giardia* pelo teste imunocromatográfico. Em relação às amostras caninas, observou-se que quase metade das amostras (49,2%) foi positiva ao teste imunocromatográfico enquanto que 50,8% foram negativas (Figura 6). No entanto, nas de origem humana apenas 13,8% foram positivas para o mesmo teste. Em relação à detecção de *G. lamblia* pelo exame microscópico observaram-se quistos de *Giardia* em 49,2% das amostras caninas e em 6,9% das amostras humanas (Figura 7). Quando se compararam os resultados obtidos por estes dois métodos (Tabela VI), verifica-se que para as amostras de origem canina os resultados obtidos, em percentagem, são iguais. No entanto, os resultados não são coincidentes nos dois métodos quando se analisam as amostras individualmente. De facto, existem 4 amostras classificadas como positivas pelo teste imunocromatográfico mas negativas através do exame microscópico e outras 4 classificadas como negativas pelo teste imunocromatográfico mas positivas através do exame microscópico (Tabela VI). Duas amostras de origem humana foram classificadas como positivas pelo teste imunocromatográfico mas negativas quando avaliadas pelo exame

microscópico. Estas discrepâncias podem ser multifactoriais. A detecção de antígenos de *Giardia* e a não observação de quistos nas amostras pode ser devida a uma fraca excreção de quistos na altura da colheita, a problemas de armazenamento e transporte das amostras ou mesmo devido a erros cometidos pelo microscopista. Por outro lado, a negatividade a antígenos de *Giardia* e a observação de quistos nas amostras não deveria ser frequente. No entanto, e segundo o próprio fabricante do produto, a utilização deste exame imunocromatográfico é apenas sugerida para a detecção qualitativa de *G. lamblia* em fezes humanas. Uma vez que a situação só foi observada em amostras caninas, tudo indica que a origem da amostra pode ter influenciado a técnica, nomeadamente através do efeito de reacções cruzadas com substâncias inibitórias presentes nas fezes dos animais. Mesmo assim, a concordância estatística entre a análise imunocromatográfica e o exame microscópico, quando analisadas apenas as amostras de origem canina, revelou-se satisfatória ($k=0,731$; $p<0,001$).

A comparação dos dois métodos, quando analisadas as amostras totais, humanas e caninas, revelou uma excelente concordância estatística ($k=0,761$; $p<0,001$). Assim, o teste imunocromatográfico mostrou-se adequado para o *screening* rápido de *Giardia*, tanto em fezes humanas como caninas. Estes dados são de elevada importância, porque nunca haviam sido publicados resultados acerca da aplicabilidade do exame imunocromatográfico, originalmente concebido para utilização em amostras de origem humana, a amostras de origem canina. Por outro lado, conseguiu-se demonstrar que este método detecta antígenos de *G. lamblia* não só nos assemblages A e B, característicos dos humanos, mas também nos assemblages C e D, considerados específicos dos cães (Tabela IX).

Considerando em simultâneo os dados obtidos pelos dois métodos de detecção atrás referidos, verificou-se que a prevalência de *G. lamblia* foi de 55,8% para as amostras de origem canina e de 13,8% para as amostras de origem humana (Tabela VI). Analisando os valores de prevalências referidos noutros estudos, verifica-se que o valor obtido neste trabalho foi um dos mais elevados até agora descritos. A grande maioria dos estudos refere prevalências de 10% em cães em idade adulta e de 30 a 50% em cachorros (Zygner *et al.*, 2006; Mundim

et al., 2007; Liu *et al.*, 2008; Meireles *et al.*, 2008). Adicionalmente, um estudo efectuado no Brasil agrupou os cães em função das condições em que viviam e obteve prevalências de 49,7% nos animais que viviam em canis (Mundim *et al.*, 2007). Assim, a elevada prevalência encontrada no presente trabalho deve estar relacionada com a origem das amostras caninas. De facto, as amostras foram obtidas num abrigo para animais (canil municipal) onde provavelmente os animais estabeleceram contactos muito próximos com a natureza, viveram em condições de higiene e alimentação precárias e estiveram sujeitos a níveis de stresse elevados. Estes factores podem contribuir para o enfraquecimento do sistema imune dos animais, aumentando deste modo a probabilidade de infecção. De facto, a prevalência geral de parasitas, protozoários e helmintas, bem como a presença de multiparasitismo foi muito elevada (Figura 8), apontando para níveis de grande susceptibilidade e de baixas condições de higiene.

Em relação à prevalência obtida em humanos, verifica-se que o valor de 13,8% obtido se encontra dentro dos valores esperados, tendo em conta o nível de desenvolvimento do país e a idade dos indivíduos incluídos neste estudo. De facto, diversos estudos efectuados em crianças referem prevalências que variam entre 12 e 28% (Chaves Mdel *et al.*, 2007; Jacobsen *et al.*, 2007; Malatyali *et al.*, 2007; Volotão *et al.*, 2007; Almerie *et al.*, 2008), apesar de em alguns casos esse valor poder ser um pouco mais baixo (Warunee *et al.*, 2007; Wani *et al.*, 2007). Curiosamente, as prevalências mais baixas foram obtidas em países considerados em vias de desenvolvimento, como a Tailândia e a Índia, locais onde seria de esperar uma maior prevalência do parasita.

Diferentes estudos têm demonstrado que a prevalência de *G. lamblia* é maior entre crianças do que em adultos (Yoder & Beach, 2007), factor este associado à falta de conhecimento e de consciencialização das regras básicas de higiene, bem como devido à imaturidade do sistema imune nesta fase da vida.

As infecções com o parasita intestinal *G. lamblia* apresentam uma dispersão global, tanto em humanos como em animais, estando já identificadas diversas vias de transmissão, principalmente através da água (Thompson, 2004). Para melhor compreender o mecanismo epidemiológico deste tipo de infecções, é necessário determinar se *G. lamblia* tem a capacidade de infectar humanos

através de uma via zoonótica e conseguir identificar os grupos de animais que possam intervir nesse processo, actuando como fontes e veículos de transmissão. Só depois de adquirido um conhecimento alargado acerca dos potenciais mecanismos zoonóticos de *G. lamblia* é que estarão reunidas as condições necessárias para se estabelecerem as medidas eficazes de prevenção e controlo da infecção.

A caracterização molecular de isolados de *G. lamblia* tem-se revelado uma ferramenta muito útil em todo este processo. De facto, permite identificar os diferentes genótipos da espécie e correlacioná-los, em função das diferenças e semelhanças, com diferentes grupos de animais e diferentes comunidades, assim como determinar de forma objectiva as fontes de infecção em grandes surtos e em casos isolados (McIntyre *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2006).

Estudos anteriores demonstraram que os cães podem desenvolver infecções, não apenas com os assemblages que lhe são específicos (C e D), mas também com os assemblages de *G. lamblia* unanimemente considerados zoonóticos (Cacciò *et al.*, 2005). Contudo, os processos epidemiológicos que servem de suporte à transmissão zoonótica ainda não foram devidamente definidos. Até hoje, apenas dois estudos conseguiram obter fortes evidências que corroboram a participação dos cães em ciclos de transmissão zoonótica de *G. lamblia* ao homem. Um dos estudos foi realizado numa comunidade relativamente isolada da região de Assam na Índia (Traub *et al.*, 2004) e outro em comunidades que viviam em templos de Bangkok na Tailândia (Inpankaew *et al.*, 2007). Nestas comunidades foi possível reunir algumas características difíceis de reproduzir noutros estudos, nomeadamente o factor isolamento e o contacto próximo entre humanos e animais. No entanto, e devido às dificuldades óbvias em encontrar comunidades deste género susceptíveis de serem estudadas, a grande maioria dos dados que encontramos na literatura foram obtidos com ensaios realizados em ambientes domésticos e/ou urbanos.

No presente trabalho caracterizaram-se geneticamente isolados de *G. lamblia* de origem humana e canina. De facto, este estudo constitui a primeira caracterização molecular de isolados caninos de *G. lamblia* em Portugal. Foi

ainda possível proceder à análise filogenética de forma a avaliar a homologia entre os isolados de Portugal bem como com os já descritos noutros países. A caracterização genética foi realizada por amplificação e restrição (PCR-RFLP) de fragmentos específicos do gene da β -giardina e por sequenciação de fragmentos específicos do mesmo gene.

Em relação aos resultados obtidos com o PCR-RFLP (Tabela VIII), verificou-se que o assemblage A foi identificado em 94,1% das amostras humanas e em 86,6% das amostras caninas positivas a *G. lamblia* (22 amostras com o assemblage A, uma com mistura de assemblage A e assemblage C e 3 com mistura de assemblage A e assemblage D). O assemblage B foi detectado em 5,9% das amostras humanas, tendo sido o assemblage C encontrado em 10% das amostras caninas (2 amostras com o assemblage C e 1 amostra com mistura de assemblage C e assemblage A) e o assemblage D em 16,7% das amostras caninas (2 com assemblage D e 3 com mistura de assemblage D e assemblage A) (Tabela VIII). Os resultados alcançados reforçam as evidências de que os humanos são apenas susceptíveis aos assemblages A e B e não aos assemblages C e D, específicos do cão.

Em relação aos resultados obtidos por sequenciação do gene da β -giardina, (Tabela IX), observa-se que o genótipo zoonótico A1 foi bastante comum entre os cães, tendo sido identificado em 87,1% das amostras e foi mais frequente que os assemblages C e D, considerados específicos destes animais. De facto, apenas 13% dos animais infectados por *G. lamblia* transportavam o assemblage C (2 amostras com o assemblage C e outras 2 com uma mistura de assemblage C e genótipo A1) e 19,4% com o assemblage D (2 amostras com o assemblage D e 4 amostras com mistura de assemblage D com genótipo A1) (Tabela IX). As co-infecções, bastante comuns entre os cães, foram detectadas em 22,6% das amostras de origem canina, envolvendo sempre o genótipo zoonótico A1 e na maioria das vezes dois assemblages diferentes (Tabela IX). Estes dados sugerem um grande nível de exposição, e consequente infecção, destes animais a diferentes fontes do parasita. Ainda de destacar a identificação do genótipo A2 numa amostra de origem canina. Esta detecção é de elevada importância, uma vez que o genótipo A2 era considerado, até há bem pouco tempo, um genótipo

antroponótico ou seja, específico do homem. De facto, existem apenas três trabalhos recentemente publicados (Lalle *et al.*, 2005b; Mendonça *et al.*, 2007; Eligio-Garcia *et al.*, 2008) que descrevem o genótipo A2 em amostras não humanas. De salientar ainda que um dos isolados A2 identificados em amostras não humanas foi obtido de um animal de casco proveniente do norte de Portugal (Mendonça *et al.*, 2007), relativamente próximo em termos geográficos da região onde foi recolhida a amostra canina do presente estudo. Tentar estabelecer uma relação entre os dois animais é altamente especulativa, mas não deixa de ser interessante verificar a presença deste genótipo, que até há bem pouco tempo era considerado específico de humanos, em dois animais que partilham uma proximidade geográfica assinalável. Estudos mais detalhados de ambos os isolados seriam de elevado interesse científico.

Os valores de genotipagem obtidos por sequenciação nas amostras de origem canina são concordantes com dados verificados noutros estudos, nomeadamente em relação à prevalência do assemblage A. De facto, num estudo realizado na Alemanha observou-se uma prevalência do assemblage A de cerca de 60% (Leonhard *et al.*, 2007) e num estudo levado a cabo no México observou-se uma prevalência de 63% (Eligio-García *et al.*, 2005). Contrariamente, outros estudos só observaram os assemblages C e D (Abe *et al.*, 2003; Rimhanen-Finne *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007; Szénási *et al.*, 2007) ou pelo menos estes eram os mais frequentes (Zygner *et al.*, 2006; Scaramozzino *et al.*, 2008).

Quando se comparam os resultados obtidos no PCR-RFLP (Tabela VIII) com a sequenciação (Tabela IX), verifica-se que a sequenciação permitiu detectar mais duas misturas de assemblages nas amostras caninas, uma com assemblage C e assemblage A e outra com assemblage D e assemblage A. Adicionalmente, a análise da sequência permitiu a identificação dos genótipos dentro de cada assemblage. A elevada prevalência do genótipo zoonótico A1 bem como a presença de um isolado A2 nos cães sugere que estes animais podem representar um risco para a saúde pública.

Estudos levados a cabo em diferentes países têm vindo a demonstrar que as prevalências dos assemblages A e B em humanos são bastante diversas.

Estudos realizados na Austrália, Canadá, Holanda, e Argentina, constataram um maior predomínio do assemblage B, em detrimento do assemblage A (Guy *et al.*, 2004; Read *et al.*, 2004; van der Giessen *et al.*, 2006; Minvielle *et al.*, 2008). No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho estão mais concordantes com aqueles adquiridos em estudos levados a cabo na Alemanha, China, Brasil, Uganda, Nova Zelândia, Egito, Portugal e México, onde tem sido referida uma maior predominância do assemblage A (Karanis & Ey., 1998; Yong *et al.*, 2000; El Graczyk *et al.*, 2002; Learmonth *et al.*, 2003; Shazly *et al.*, 2004; Sousa & Poiars da Silva, 2004; Lalle *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2006; Volotão *et al.*, 2007). A prevalência do assemblage B foi apenas de 5,9 %, estando todas as outras amostras infectadas com isolados do assemblage A (Tabela IX). No entanto, é necessário ter algum cuidado quando se comparam as prevalências obtidas nos vários estudos publicados, uma vez que as genotipagens são muitas vezes levadas a cabo em populações heterogêneas, nomeadamente em relação à idade e sintomatologia dos indivíduos estudados.

Nas amostras de origem humana também foram detectadas co-infecções em algumas amostras, sendo que, e ao contrário do que sucedeu com a maioria das amostras de origem canina, nenhuma delas envolveu misturas de assemblages diferentes. De facto, das 6 amostras (17,6%), onde foram detectadas co-infecções, 4 envolveram genótipos do assemblage A (11,8%) e 2 envolveram genótipos do assemblage B (5,9%). A ocorrência de infecções mistas tem vindo a ser descrita em vários países, situando-se a sua prevalência entre os 2% e 21% (Hopkins *et al.*, 1997; Traub *et al.*, 2004; Lalle *et al.*, 2005a,b). A ocorrência de co-infecções pode reflectir uma complexa circulação do parasita no ambiente e a exposição dos humanos a diversas fontes de contaminação. De facto, tendo em conta que *Giardia* é um organismo aparentemente assexuado, que se multiplica por divisão mitótica, a comunidade científica tem vindo a interpretar a presença de mais do que um único nucleótido na mesma posição de uma sequência genética como uma co-infecção do parasita. No entanto, segundo alguns estudos recentes, é possível que ocorra recombinação meiótica neste organismo, e que ela possa ser responsável pela “falsa” identificação de diferentes genótipos nas mesmas amostras (Cooper *et al.*, 2007; Teodorovic *et al.*, 2007). De facto, alguns

resultados sugerem a presença de recombinação entre isolados do genótipo A2 de origem humana (Cooper *et al.*, 2007) e entre os genótipos A1 e B de isolados axenizados (Teodorovic *et al.*, 2007). Neste trabalho, e partindo do princípio defendido por estes autores, podem ter sido estudadas amostras onde tenha ocorrido recombinação entre isolados dos assemblages A (A1, A2 e A3) (Tabela IX) e entre os isolados do assemblage B (B2, B3 e B4) (Tabela IX) e, portanto, não corresponderem a verdadeiras co-infecções. Contudo, e apesar dos dados anteriormente citados sugerirem que a recombinação meiótica possa ocorrer em *G. lamblia*, a reprodução sexuada ainda não foi directamente observada. Para além disso, o seu impacto na genética do organismo é algo que continua por elucidar (Birky, 2005; Logsdon, 2008).

O estudo filogenético realizado pela comparação das sequências do gene da β -giardina revelou elevada homologia entre isolados humanos e caninos identificados no assemblage A (Figura 17). De salientar o facto de 2 amostras humanas estudadas, H25 e X4, apresentarem uma alteração num nucleótido em relação às restantes sequências incluídas nos genótipos A1 e A3, respectivamente (Figura 16). Uma dessas amostras difere apenas num nucleótido (nt 421) das sequências características do genótipo A1, enquanto a outra difere num nucleótido das sequências típicas do genótipo A3 (nt 436) (Figura 16). No entanto, ambas as amostras necessitam de ser analisadas em outros *loci* de genes, de modo a se confirmar se as alterações observadas podem ser associadas ou não a um novo genótipo.

Em conclusão, podemos referir o predomínio evidente do assemblage A em ambos os grupos estudados, sugerindo que os cães podem desempenhar um papel importante em ciclos zoonóticos de *G. lamblia*, actuando como receptores, reservatórios e/ou transmissores do parasita, em diferentes fases do ciclo. De facto, verificou-se que os isolados do genótipo A1 e A2 encontrado nos cães são idênticos aos isolados do mesmo genótipo encontrado nas amostras de origem humana (Figuras 16 e 17). Contudo, qualquer conclusão sobre a transmissão zoonótica deve ser feita com precaução, uma vez que a detecção de genótipos similares ou diferentes, dispersos em diversos hospedeiros não é, por si só, prova conclusiva da ocorrência ou não ocorrência de transmissão (Thompson, 2004).

Embora a caracterização molecular de *Giardia* de diferentes hospedeiros seja imperativa para o estudo epidemiológico da giardíase no homem e animais, outros estudos contemplando os clássicos factores de risco e vigilância cruzada são necessários de forma a compreender a dinâmica da transmissão de *Giardia* nas áreas endémicas e para determinar o nível de participação de cada hospedeiro como fonte de infecção para indivíduos susceptíveis e populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abboud, P., Lemee, V., Gargala, G., Brasseur, P., Ballet, J. J., Borsa-Lebas, F., Caron, F. & Favennec, L. 2001. Successful treatment of metronidazole- and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Clin. Infect. Dis. **32**:1792-1794.

Abdul-Wahid, A. & Faubert, G. 2007. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. Int J Parasitol. **38**:691-703.

Abdul-Wahid, A. & Faubert, G. 2007. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bacteriofection vehicle. Vaccine. **25**:8372-83

Abe, N., Kimata, I. & Iseki, M. 2003. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci. **65**:29-33.

Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia spp.* Microbiol. Rev. **55**:706-32.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. **14**:447-75.

Aley, S. B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M. E., & Gillin, F. D. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. Infect. Immun. **62**:5397–5403.

Ali, V. & Nozaki, T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. Clin Microbiol Rev. **20**:164-87.

Almeida, A. A., Delgado, M. L., Soares, S. C., Castro, A. O., Moreira, M. J., Mendonça, C. M., Canada, N. B. & Da Costa, J. M. 2006. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. J Eukaryot Microbiol. **53**:177-8.

Almerie, M. Q., Azzouz, M. S., Abdessamad, M. A., Mouchli, M. A., Sakbani, M. W., Alsibai, M. S., Alkafri, A. & Ismail, M. T. 2008. Prevalence and risk factors for giardiasis among primary school children in Damascus, Syria. Saudi Med J. **29**:234-40.

Altman, D. G. 1991. Practical Statistics for Medical Research. Chapman and Hall, London.

Alonso, R. A. & Peattie, D. A. 1992. Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of the alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. **50**:95–104.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25**:3389-402.

Aydin, A. F., Besirbellioglu, B. A., Avci, I. Y., Tanyuksel, M., Araz, E. & Pahsa, A. 2004. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **50**:147–151.

Bingham, A. K. & Meyer, E. A. 1979. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. Nature (London). **277**:301–302.

Birky, C. W. Jr. 2005. Sex: is *Giardia* doing it in the dark? Curr Biol. **15**:R56-8.

Black, R. E., Dykes, A. C., Sinclair, S. P. & Wells, J. G. 1977. Giardiasis in day-care centers: evidence of person-to-person transmission. Pediatrics **60**:486-491.

- Brandborg, L. L., Tankersley, C. B., Gottlieb, S., Barancik, M. & Sartor, V. E.** 1967. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology* **52**:143-150.
- Brodsky, R. E., Spencer, H. C. Jr. & Schultz M. G.** 1974. Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. *J. Infect. Dis.* **130**:319.
- Buchel, L. A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J. & Gobert, J. G.** 1987. In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J. Parasitol.* **73**:487–493.
- Buret, A. G., Mitchell, K., Muench, D. G. & Scott, K. G. E.** 2002. *Giardia Lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* **125**:11–19.
- Cacciò, S. M., de Giacomo, M. & Pozio, E.** 2002. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a PCR-RFLP assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* **32**:1023–1030.
- Cacciò, S. M., Thompson, R. C. A., McLauchlin, J. & Smith, H. V.** 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* **21**:430–437.
- Cacciò, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A. & Pozio, E.** 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int. J. Parasitol.* (in press), doi:10.1016/j.ijpara.2008.04.008
- Carlin, E. P., Bowman, D. D., Scarlett, J. M., Garrett, J. & Lorentzen, L.** 2006. Prevalence of *Giardia* in symptomatic dogs and cats throughout the United States as determined by the IDEXX SNAP *Giardia* test. *Vet Ther.* **7**:199-206.

Castro-Hermida, J. A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J. M., Rumbo-Lorenzo, C. & Mezo M. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol Res.* **101**:1443-8.

Chaves Mdel, P., Fernández, J. A., Ospina, I., López, M. C., Moncada, L. & Reyes, P. 2007. *Giardia duodenalis* prevalence and associated risk factors in preschool and school-age children of rural Colômbia Biomedica. **27**:345-51.

Chin, A. C., Teoh, D. A., Scott, K. G-E., Meddings, J. B., Macnaughton, W. K. & Buret, A. G., 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* **70**:3673–3680.

Coklin, T., Farber, J., Parrington, L. & Dixon B. 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol.* **150**:297-305.

Cooper, M. A., Adam, R. D., Worobey, M. & Sterling, C. R. 2007. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol.* **17**:1984-8

Craun, G. F. 1986. Waterborne giardiasis in the United States 1965–1984. *Lancet* **ii**:513–514.

Danciger, M. & Lopez, M. 1975. Numbers of *Giardia* in the feces of infected children. *Am J Trop Med Hyg.* **24**:237-42.

Daniels, C. W. & Belosevic, M. 1994. Serum antibody responses by male and female C57BL/6 mice infected with *Giardia muris*. *Clin. Exp. Immunol.* **97**:424–429.

Dobell, C. 1920. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc. R. Soc. Med.* **13**:1–15.

Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F. & Gillin, F. D. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. J. Immunol. **164**:1478–1487.

El-Shazly, A., Mowafy, N., Soliman, M., El-Bendary, M., Morsy, A., Ramadan, N. & Arafa, W. 2004. Egyptian genotyping of *Giardia lamblia*. J Egypt Soc Parasitol **34**: 265-280.

Eligio-García, L., Cortes-Campos, A. & Jiménez-Cardoso, E. 2005. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. Parasitol Res. **97**:1-6.

Eligio-Garcia, L., Cortes-Campos, A., Cota-Guajardo, S., Gaxiola, S. & Jiménez-Cardoso, E. 2008. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using b-giardin restriction gene. Vet Parasitol. **156**:205-209.

Erlandsen, S. L. & Chase, D. G. 1974. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. Am. J. Clin. Nutr. **27**:1277–1286.

Erlandsen, S. L. & Bemrick, W. L. 1987. SEM evidences for a new species *Giardia psittaci*. J. Parasitol. **73**:623–629.

Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., Wellis, C. L., Feely, D. E., Kundson, L., Cambell, S. R., van Keulen, H. & Jarrol, E. L. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J. Parasitol. **76**:717–724.

Erlandsen, S. L., Macechko, P. T., van Keulen, H. & Jarroll, E. L. 1996. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. J. Eukaryot. Microbiol. **43**:416–429.

Escobedo, A. A. & Cimerman, S. 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. Expert Opin Pharmacother. **8**:1885-902.

Ey, P. L., Mansouri, M., Kulda, J., Nohynkova, E., Monis, P. T., Andrews, R. H. & Mayrhofer, G. 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyls-specific and potentially zoonotic genotypes. J. Euk. Microbiol. **44**:626–635.

Faubert, G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev **13**:35-54.

Fayer, R., Santín, M., Trout, J. M., Dubey, J. P. 2006. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. Vet Parasitol. **140**:44-53.

Feely, D. E., Schollmeyer, J. V. & Erlandsen, S. L. 1982. *Giardia spp.*: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. Exp. Parasitol. **53**:145–154.

Feely, D. E. 1988. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. J. Protozool. **35**:52–54.

Filice, F. P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. Calif. Publ. Zool. **57**:53-143.

- Garcia, L. S., Shimizu, R. Y., Novak, S., Carroll, M. & Chan, F.** 2003. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. J Clin Microbiol. **41**:209-12
- Gardner, T. B. & Hill, D. R.** 2001. Treatment of giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. **14**:114-28.
- Ghosh S., Debnath A., Sil A., De Schattopadhyay D. J. & Dai P.** 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. Mol Cell Probes. **14**:181-189.
- Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R. & Samuelson, J.** 2001. How *Giardia* swim and divide. Infect Immun. **69**:7866-72.
- Gillin, F. D. & Reiner, D. S.** 1982. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. Mol. Cell. Biol. **2**:369–377.
- Gillin, F. D. & Diamond, L. S.** 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. Exp. Parasitol. **52**:9–17.
- Gillin, F. D.** 1987. *Giardia lamblia*: the role of conjugated and unconjugated bile salts in killing by human milk. Exp. Parasitol. **63**:74–83.
- Gillin, F. D., Reiner, D. S. & McCaffery, J. M.** 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu. Rev. Microbiol. **50**:679–705.
- Gilman, R. H., Marquis, G. S., Miranda, E., Vestegui, M. & Martinez, H.** 1988. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. Lancet **1**:343-345.

Graczyk, T., Bosco-nizayi, J., Ssebide, B., Thompson, R., Read, C. & Cranfield, M. 2002. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) a infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. J Parasitol **88**: 905-909.

Guy, R., Xiao, C. & Horgen, P. 2004. Real time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. J Clin Microbiol **42**: 3317-3320.

Hackett, T. & Lappin, M. R. 2003. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. J Am Anim Hosp Assoc. **39**:52-6.

Hamnes, I. S., Gjerde, B. K., Forberg, T. & Robertson, L. J. 2007. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). Vet Parasitol. **143**:347-53.

Haque, R., Roy, S., Kabir, M., Stroup, S. E., Mondal, D. & Houpt, E. R. 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. J Infect Dis. **192**:2171-3.

Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., Svard, S. G., Meng, T. C., Que, X. & Gillin, F. D. 1998. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. Exp. Parasitol. **88**:172–183.

Holberton, D. V. 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. J. Cell Sci. **13**:11-41.

Holberton, D., Baker, D. A. & Marshall, J. 1988. Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. J. Mol. Biol. **204**:789–795.

Holtan, N. R. 1988. Giardiasis. A crimp in the life-style of campers, travelers, and others. Postgrad Med. **83**:54-6, 59-61.

Homan, W. L. & Mank, T. G. 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int. J. Parasitol.* **31**:822–826.

Homan, W. L., van Enkevort, F. H., Limper, L., van Eys, G. J., Schoone, G. J., Kasprzak, W., Majewska, A. C. & van Knapen, F. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res.* **78**:316-23.

Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* **83**:44-51.

Huetink, R. E. C., van der Giessen, J. W., Noordhuizen, J. P. & Ploeger, H. W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet. Parasitol.* **102**:53.

Inpankaew, T., Traub, R., Thompson, R. C. & Sukthana, Y. 2007. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **38**:247-55.

Itagaki, T., Kinoshita, S., Aoki, M., Itoh, N., Saeki, H., Sato, N., Uetsuki, J., Izumiyama, S., Yagita, K. & Endo, T.. 2005. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet Parasitol.* **133**:283-7.

Jacobsen, K. H, Ribeiro, P. S., Quist, B. K. & Rydbeck, B. V. 2007. Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. *J Health Popul Nutr.* **25**:399-405.

Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., Coggins, J. R. & Erlandsen, S. L. 1989. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**:121–131.

Jephcott, A. E., Begg, N. T. & Baker, I. A. 1986. Outbreak of giardiasis associated with mains water in the United Kingdom. *Lancet* **ii**:730–732.

Jiménez, J. C., Uzcanga, G., Zambrano, A., Di Prisco, M. C. & Lynch, N. R. 2000. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. *J Parasitol* **86**:859-862.

Katz, D. E. & Taylor, D. N. 2001. Parasitic infections of the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Clin North Am* **30**:797-815.

Kabnick, K. S. & Peattie, D. A. 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell Sci.* **95**:353–360.

Karanis, P. & Ey, P.L. 1998. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol. Res.* **84**:442–449.

Katellaris, P. H., Naeem, A. & Farthing, M. J. 1994. Activity of metronidazole, azithromycin and three benzimidazoles on *Giardia lamblia* growth and attachment to a human intestinal cell line. *Aliment Pharmacol Ther.* **8**:187-92.

Kaur, H., Ghosh, S., Samra, H., Vinayak, V. K & Ganguly, N. K. 2001. Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology* **123**:347-356.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. & Zinkernagel, R. M. 2005. *Medical Microbiology*. 10th Ed., Thieme. Stuttgart.

Kofoed, C. A. & Christensen, E. B. 1915. On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). *Univ. Calif. Publ. Zool.* **16**:30–54.

Kulda, J. & Nohýhová, E. 1995. *Giardia* in Humans and Animals. In *Parasitic protozoa*. (Julius P. Kreier, ed.) pp.352-357, Academic Press.

Lai, P. S. & Mayer, L. 1997. Gastrointestinal manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Semin. Gastrointest. Dis.* **8**:22–32.

Lalle, M., Jimenez-Cardosa, E., Cacciò, S. M. & Pozio, E. 2005. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol.* **91**:203-5.

Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D. & Cacciò, S. M. 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* **35**:207-13.

Lambl, W. 1859. Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr. Prakst. Heikunde* **61**:1–58.

Lane, S. & Lloyd, D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**:123–147.

Langford, T. D., Housley, M. P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M. F., Gillin, F. D. & Eckmann, L. 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia spp.* *Infect Immun* **70**:11-18.

Langkjaer, R. B., Vigre, H., Enemark, H. L. & Maddox-Hyttel, C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* **134**:339-50.

Lee, P. & Faubert, G. M. 2006. Oral immunization of BALB/c mice by intragastric delivery of *Streptococcus gordonii*-expressing *Giardia* cyst wall protein 2 decreases cyst shedding in challenged mice. *FEMS Microbiol Lett.* **265**:225-36.

Leonhard, S., Pfister, K., Beelitz, P., Wielinga, C. & Thompson, R. C. 2007. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet Parasitol.* **150**:33-8.

Learmonth, J., Ionas, G., Pita, A. & Cowie, R. 2003. Identification and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in human and dairy cattle in Waikato region of New Zealand. *Water Sci Technol* **47**: 21-26.

Liu, J., Lee, S. E. & Song, K. H. 2008. Prevalence of canine giardiasis in South Korea. *Res Vet Sci*. **84**:416-418.

Logsdon, J. M. Jr. 2008. Evolutionary genetics: sex happens in *Giardia*. *Curr Biol*. **18**:R66-8.

Luján, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. & Nash, T. E. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem* **270**:29307–29313.

Luján, H. D., Mowatt, M. R. & Nash, T. E. 1997. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:294–304.

Malatyali, E., Özçelik, S., Celiksöz, A., Değerli, S. & Yildirim, D. 2008. The Frequency of Intestinal Parasites in Primary School Children in Urban and Rural Regions. *Turkiye Parazitol Derg.* **32**:54-58.

Marti, M., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Kohler, P. & Hehl, A. B. 2003a. The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient golgi-like compartments. *Mol. Biol. Cell.* **14**:1433–1447.

Marti, M., Regos, A., Li, Y., Schraner, E. M., Wild, P., Muller, N., Knopf, L. G. & Hehl, A. B. 2003b. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **278**:24837–24848.

Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Ey, P. L. & Chilton, N. B. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*. **111**:11-17.

McDonnell, P. A., Scott, K. G.-E., Teoh, D. A., Olson, M. E., Upcroft, J. A., Upcroft, P. & Buret, G. 2003. *Giardia duodenalis* trophozoites isolated from a parrot (*Cacatua galerita*) colonize the small intestinal tracts of domestic kittens and lambs. *Vet. Parasitol.* **111**:31–46.

McGlade, T. R., Robertson, I. D., Elliot, A. D. & Thompson, R. C. A. 2003. High Prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet. Parasitol.* **110**:197–205.

McIntyre, L., Hoang, L., Ong, C. S., Lee, P. & Isaac-Renton, J. L. 2000. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *J Parasitol.* **86**:172-7.

McRoberts, K. M., Meloni, B. P., Morgan, U. M., Marano, R., Binz, N., Erlandsen, S. L., Halse, S. A. & Thompson, R. C. A., 1996. Morphological and molecular characterisation of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *J. Parasitol.* **82**:711–718.

Meireles P., Montiani-Ferreira, F. & Thomaz-Soccol, V. 2008. Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Vet Parasitol.* **152**:242-8.

Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J. M. & Canada, N. 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol.* **20**:47-50.

Meyer, E. A. 1990. *Giardiasis*. Elsevier Publishing Co., New York, N.Y.

Minvielle, M. C., Molina, N. B., Polverino, D. & Basualdo, J. A. 2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. **103**:98-103.

Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. & Ey, P. L. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol. Biol. Evol. **16**:1135–1144.

Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. & Ey, P. L. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect. Genet. Evol. **3**:29–38.

Monis, P. T., Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Homan, W. L., Limper, L. & Ey, P. L. 1996. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. **112**:1-12.

Monis, P. T. & Thompson, R. C. A. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonoses: fact or fiction? Infect. Genet. Evol. **3**:233–244.

Moore, G. T., Cross, W. M., McGuire, D., Mollohan, C. S., Gleason, N. N., Healy, G. R. & Newton, L. H. 1969. Epidemic giardiasis at a ski resort. N. Engl. J. Med. **281**:402–407.

Moro, D., Lawson, M. A., Hobbs, R. P. & Thompson, R. C. A. 2003. Pathogens of house mice on arid Boullanger Island and subantarctic Macquarie Island, Australia. J. Wildl. Dis. **39**:762–771.

Mowatt, M. R., Luján, H. D., cotton, D. B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T. E. & Stibbs, H. H. 1995. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. Mol Microbiol **15**:955–963.

- Mundim, M. J., Rosa, L. A., Hortêncio, S. M., Faria, E. S., Rodrigues, R. M. & Cury, M. C.** 2007. Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Vet Parasitol.* **144**:356-9.
- Nash, T. E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J. B., Conrad, J. D. & Gillin, F. D.** 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Infect Dis.* **152**:64-73.
- Nohria, A., Alonso, R. A. & Peattie, D. A.** 1992. Identification and characterization of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**:27–37.
- O’Handley, R. M., Olson, M. E., Fraser, D., Adams, P. & Thompson, R. C. A.,** 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet. Parasitol.* **90**:193–200.
- O’Handley, R. M. & Olson, M. E.** 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **22**:623-43.
- Olson, M. E., McAllister, T. A. & Deselliers, L.** 1995. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am. J. Vet. Res.* **56**:1470–1474.
- Olson, M. E., Ryan O’Handley, R., Ralston, B. & Thompson, R. C. A.,** 2004. Emerging issues of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* **20**:185–191.
- Onbaşı, K., Günşar, F., Sin, A. Z., Ardeniz, O., Kokuludağ, A. & Sebik, F.** 2005. Common variable immunodeficiency (CVID) presenting with malabsorption due to giardiasis. *Turk J Gastroenterol.* **16**:111-3.
- Paget, T. A., Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G. & Lloyd, D.** 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *J Gen Microbiol.* **135**:145-54.

Papini, R., Cardini, G., Paoletti B. & Giangaspero A. 2007. Detection of *Giardia* assemblage A in cats in Florence, Italy. *Parasitol Res.* **100**:653-6.

Peattie, D. A., Alonso, R. A., Hein, A. & Caulfield, J. P. 1989. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* **109**:2323-2335.

Piva, B. & Benchimol, M. 2004. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell.* **96**:735-46.

Ravid, Z., Duque, S., Arévalo, A., Nicholls, R. S. & Wasserman, M. 2007. Genetic diversity of *Giardia intestinalis* populations in Colombia. *Biomedica.* **27**:34-41.

Read, C. M., Monis, P. T. & Thompson, R. C. A. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Gen. Evol.* **4**:125–130.

Reiner, D. S., Wang, C. S. & Gillin, F. D. 1986. Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *J. Infect. Dis.* **154**:825–832.

Rendtorff, R. C. 1954 The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* **59**:209-220.

Rimhanen-Finne, R., Enemark, H. L., Kolehmainen, J., Toropainen, P. & Hänninen, M. L. 2007. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* **145**:345-8.

- Robertson, L. J., Hermansen, L., Gjerde, B. K., Strand, E., Alvsvåg, J. O. & Langeland, N.** 2006. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Appl Environ Microbiol.* **72**:2212-7.
- Robertson, L. J., Forberg, T., Hermansen, L., Hamnes, I. S. & Gjerde, B.** 2007. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-rflp and sequence analysis at two genes. *J Wildl Dis.* **43**:576-85.
- Roberts-Thomson, I. C., Grove, D. I., Stevens, D. P. & Warren, K. S.** 1976. Suppression of giardiasis during the intestinal phase of trichinosis in the mouse. *Gut.* **17**:953-8.
- Rohrer, L., Winterhalter, K. H., Eckert, J. & Kohler, P.** 1986. Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:254–257.
- Sahagún, J., Clavel, A., Goñi, P., Seral, C., Llorente, M. T., Castillo, F.J., Capilla, S., Arias, A. & Gómez-Lus, R.** 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **27**:81-3.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**:5463-7.
- Satchithanandam, S., Vargofcak-Apker, M., Calvert, R. J., Leeds, A.R. & Cassidy, M. M.** 1990. Alteration of gastrointestinal mucin by fiber feeding in rats. *J Nutr* **120**:1179-1184.

Scaramozzino, P., Di Cave, D., Berrilli, F., D'Orazi, C., Spaziani, A., Mazzanti, S., Scholl, F. & De Liberato, C. 2008. A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. Vet J. 2008 (in press). doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.003

Schmerin, M. J., Jones, T. C. & Klein, H. 1978 Giardiasis: association with homosexuality. Annls Int.Med. **88**:801-803.

Scott, K. G., Logan, M. R., Klammer, G. M., Teoh, D. A. & Buret, A. G. 2000. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. Infect Immun. **68**:3412-8.

Scott, K. G., Meddings, J. B., Kirk, D. R., Lees-Miller, S. P. & Buret, A. G. 2002. Intestinal infection with *Giardia spp.* Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. Gastroenterology **123**:1179–1190.

Scott, K. G., Yu, L. C. & Buret, A. G. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. Infect Immun **72**:3536-42.

Shukla, R., Giraldo, P., Kraliz, A., Finnigan, M. & Sanchez, A. L. 2006. *Cryptosporidium spp.* and other zoonotic enteric parasites in a sample of domestic dogs and cats in the Niagara region of Ontario. Can Vet J. **47**:1179-84.

Simpson, A. G., Roger, A. J., Silberman, J. D., Leipe, D. D., Edgcomb, V. P., Jermini, L. S., Patterson, D. J. & Sogin, M. L. 2002. Evolutionary history of “early-diverging” eukaryotes: the excavate taxon *Carpediemonas* is a close relative of *Giardia*. Mol. Biol. Evol. **19**:1782–1791.

Singer, S. M. & Nash, T. E. 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. Infect Immun. **68**:170-5.

- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A. & Tait, A.** 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol.* **149**:29-40.
- Snider, D. P., Gordon, J., McDermott, M. R. & Underdown, B. J.** 1985. Chronic *Giardia muris* infection in anti-IgM-treated mice. I. Analysis of immunoglobulin and parasite-specific antibody in normal and immunoglobulin-deficient animals. *J. Immunol.* **134**:4153–4162.
- Snider, D. P., Skea, D. & Underdown, B. J.** 1988. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the *xid* gene. *Infect. Immun.* **56**:2838–2842.
- Sousa, M. C. & Poiares da Silva, J.** 2004. Characterization of human isolates of *Giardia lamblia* from Portugal. *Int J Infect Dis* **8**: 218.
- Sousa, M. C., Morais, J. B., Machado, J. E. & Poiares da Silva, J.** 2006. Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *J Eukaryot Microbiol.* **53**:174-6.
- Souza S. L., Gennari, S. M., Richtzenhain, L. J., Pena, H. F., Funada, M. R., Cortez, A., Gregori, F. & Soares, R. M.** 2007. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (*gdh*) coding gene. *Vet Parasitol.* **149**:258-64.
- Stäger, S. & Müller, N.** 1997. *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect. Immun.* **65**:3944–3946.
- Sun, C. H., McCaffery, J. M., Reiner, D. S. & Gillin, F. D.** 2003. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J Biol Chem* **278**:21701–21708.

Szénási, Z., Marton, S., Kucsera, I., Tánczos, B., Horváth, K., Orosz, E., Lukács, Z. & Szeidemann, Z. 2007. Preliminary Investigation of the Prevalence and Genotype Distribution of *Giardia intestinalis* in Dogs in Hungary. *Parasitol Res.* **101**:145-152

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.

Teodorovic, S., Braverman, J. M. & Elmendorf, H. G. 2007. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot Cell.* **6**:1421-30.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.

Thompson, R. C. A., Hopkins, R. M. & Homan, W. L. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol. Today* **16**:210–213.

Thompson, R. C. A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitology.* **126**:15-35.

Thompson, R. C. A. & Robertson, I. D. 2003. Gastrointestinal parasites of dogs and cats: current issues. *Compend. Cont. Ed.* **25**:4–11.

Traub, R. J., Monis, P. T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N. & Thompson, R. C. A. 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology.* **128**:253-62.

- Trout, J. M., Santini, M. & Fayer, R.** 2003. Identification of Assemblage A *Giardia* in white-tailed deer. *J. Parasitol.* **89**:1254–1255.
- Trout, J. M., Santín, M. & Fayer, R.** 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *J Zoo Wildl Med.* **37**:141-4.
- Trout, J. M., Santín, M. & Fayer, R.** 2007. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Vet Parasitol.* **147**:205-9.
- Tůmová, P., Hofstetrová, K., Nohýnková, E., Hovorka, O. & Král, J.** 2007. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma.* **116**:65-78.
- van der Giessen, J. W., de Vries, A., Roos, M., Wielinga, P., Kortbeek, L. M. & Mank, T. G.** 2006. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol.* **36**:849-58.
- van Keulen, H., Feely, D. E., Macechko, T., Jarrol, E. L. & Erlandsen, S. L.** 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J. Parasitol.* **84**:294–300.
- Vasilopoulos, R. J., Rickard, L. G., Mackin, A. J., Pharr, G. T. & Huston, C. L.** 2007. Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cats. *J Vet Intern Med.* **21**:352-5.
- Volotão, A. C., Costa-Macedo, L. M., Haddad, F. S., Brandão, A., Peralta, J. M. & Fernandes, O.** 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* **102**:10-9.
- Wani, S. A., Ahmad, F., Zargar, S. A., Ahmad, Z., Ahmad, P. & Tak, H.** 2007. Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors among schoolchildren in Srinagar City, Kashmir, India. *J Parasitol.* **93**:1541-3.

Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, J. C., Franklin, C. & McKerrow, J. H. 1997. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* **89**:437–444.

Warunee, N., Choomanee, L., Sataporn, P., Rapeeporn, Y., Nuttapong, W., Sompong, S., Thongdee, S., Bang-On, S. & Rachada, K. 2007. Intestinal parasitic infections among school children in Thailand. *Trop Biomed.* **24**:83-8.

Weiss, J. B. 1993. PCR detection of *Giardia lamblia* In Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. (Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F., White, T. J., ed.) pp.480-485, ASM, Washington, D C.

WHO. 1996. The World Health Report 1996. Fighting Disease Fostering Development. World Health Organization, Geneva.

WHO Expert Committee. 1981. Intestinal protozoan and helminthic infections. WHO Tech. Rep. Ser. **58**:666–671.

Wiesehahn, G. P., Jarroll, E. L., Lindmark, D. G., Meyer, E. A. & Hallick, L. M. 1984. *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Exp. Parasitol.* **58**:94–100.

Wolfe, M. S. 1992. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* **5**:93-100.

Xiao, L. & Herd, R. P. 1994. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet. Parasitol.* **55**:257–262.

Yoder, J. S. & Beach, M. J. 2007. Giardiasis surveillance--United States, 2003-2005. *MMWR Surveill Summ.* **56**:11-8.

Yong, T., Park, S., Hwang, U., Yang, H., Lee, K., Min, D., Rim, H., Wang, Y. & Zheng, F. 2000. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from humans in China and Korea using ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* **86**: 887-891.

Zygner, W., Jaros, D., Skowrońska, M., Bogdanowicz-Kamirska, M. & Wedrychowicz, H. 2006. Prevalence of *Giardia intestinalis* in domestic dogs in Warsaw. *Wiad Parazytol.* **52**:311-5.

ANEXO I

Preparação de soluções

Preparação de 500 mL de solução de Tris-borato-EDTA (TBE) 10×

Para preparar uma solução de TBE (10×) pesou-se:

- 7,44 g de EDTA (M = 372,24 g), 0,5 M, pH 8.0.
- 54 g de Tris base (M = 121,1 g).
- 27,5 g de ácido bórico (M = 61,8 g)

Adicionou-se cerca de 500 mL de água destilada. Na preparação do EDTA, mediu-se o pH e ajustou-se com NaOH até se obter pH 8.0.

Preparação de 100 mL de gel de agarose

Para 100 mL de gel de agarose 1% adicionou-se 1 g de agarose a 100 mL de TBE 1x. Seguidamente levou-se ao microondas até a agarose se dissolver por completo, resultando uma solução transparente e homogênea. Depois da solução arrefecer até $\approx 50^{\circ}\text{C}$ adicionou-se 1,25 μL de Brometo de Etídio e agitou-se até homogeneizar. Finalmente coloca-se a solução no suporte e deixou-se solidificar.

Preparação de solução *stock* e de trabalho de Primers

G7 (39,2 nmol)

Adicionou-se 392 μL de água ultra pura para se obter uma solução *stock* de 100 μM . Para obter uma solução de trabalho a 10 μM , retirou-se 10 μL de solução *stock* e adicionou-se 90 μL de água ultra pura (solução 1:10).

G759 (40,9 nmol)

Adicionou-se 409 μL de água ultra pura para se obter uma solução *stock* de 100 μM . Para obter uma solução de trabalho a 10 μM , retirou-se 10 μL de solução *stock* e adicionou-se 90 μL de água ultra pura (solução 1:10).

G376 (35,7 nmol)

Adicionou-se 357 μL de água ultra pura para se obter uma solução *stock* de 100 μM . Para obter uma solução de trabalho a 10 μM , retirou-se 10 μL de solução *stock* e adicionou-se 90 μL de água ultra pura (solução 1:10).

G2005F (34,9 nmol)

Adicionou-se 349 μL de água ultra pura para se obter uma solução *stock* de 100 μM . Para obter uma solução de trabalho a 10 μM , retirou-se 10 μL de solução *stock* e adicionou-se 90 μL de água ultra pura (solução 1:10).

G2005R (29,1 nmol)

Adicionou-se 291 μL de água ultra pura para se obter uma solução *stock* de 100 μM . Para obter uma solução de trabalho a 10 μM , retirou-se 10 μL de solução *stock* e adicionou-se 90 μL de água ultra pura (solução 1:10).

Preparação de solução de sacarose a 1 M

Preparou-se cerca de 200 mL de solução de sacarose 1 M. Assim, a cerca de 200 mL de água destilada adicionou-se 68,46 g de sacarose ($M = 342,30\text{g}$) e agitou-se até se obter uma solução homogênea.

ANEXO II

Genótipos identificáveis no fragmento do gene da β -giardina estudado

A1

G AAC GAG ATC GAG GTC

A1	CGC	CGC	GTC	GAC	GAC	ACG	CGC	GTC	AAG	ATG	ATC	AAG	GAC	GCC	ATC	GCA	CAC	CTC	GAC	AGG	CTC	ATC	CAG	ACG	GAG	TCG	AGG	AAG
B1TGTAA
CCTGC
D1TT	..CTTT
ET
FG

A1	CGC	CAG	GCC	TCG	TTC	GAG	GAC	ATC	CGC	GAG	GAG	GTC	AAG	AAG	TCC	GCC	GAC	AAC	ATG	TAC	CTA	ACG	ATC	AAG	GAG	GAG	ATC	GAC	ACC
B1ATGT
CGGA
D1A	AG	..CATT	..GTA	
ETTG	..AA
FG

A1	ATG	GCT	GCA	AAC	TTC	CGC	AAG	TCC	CTT	GCG	GAG	ATG	GGC	GAC	ACA	CTC	AAC	AAC	GTT	GAG	ACA	AAT	CTC	CAG	AAC	CAG	ATC	GCC	ATC	
B1CTTGCG	..C	
CC	..GC	..CG	..CCC	
D1CC	..AG	..GCC	
ET	..CAC	
FA	..CATC

[illegible][illegible]

A1	CTC	GAG	GAC	GTC	GTC	TCG	AAG	ATC	CAG	GGC	GGC	CTC
A2
A3
B1
B2
B3
E

A sequência tem início no nt 99 e termina no nt 759, enumerados a partir do codão de iniciação ATG da estirpe de referência Portland-1, número de acesso X14185 no *GenBank* (Cacciò *et al*, 2002 e Lalle *et al*, 2005).